

**Détermination de la structure secondaire de TLC1,
l'ARN de la télomérase chez *Saccharomyces spp.*
par analyse phylogénétique**

Par

Alain T. Dandjinou

Thèse présentée à la Faculté de Médecine

En vue de l'obtention du grade de

philosophiae doctor (Ph.D) en Microbiologie

Déposée le 14 septembre 2004

Soutenue le 8 novembre 2004



UNIVERSITÉ DE
SHERBROOKE

**Faculté de médecine
et des sciences de la santé**



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 0-494-14850-0

Our file Notre référence

ISBN: 0-494-14850-0

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

COMPOSITION DU JURY

Dr. Simon Labbé	Rapporteur externe au programme
Dr. Joachim Lingner	Rapporteur externe à l'Université
Dr. Claudine Rancourt	Président et responsable du programme
Dr. Raymund Wellinger	Directeur de Thèse

Ce travail est dédié à Basilia et à Cosme, qui ont toujours pensé que le plus précieux legs qu'ils pouvaient faire à leurs enfants était de leur donner les moyens de s'instruire.

TABLE DES MATIÈRES

Table des matières	I
Figures et tableaux	IV
Abréviations	VII
Résumé	IX
Introduction	1
1. Les télomères.....	1
2. L'ADN aux extrémités des chromosomes.....	2
2.1. L'ADN des télomères.....	2
2.2. Les séquences sous-télomérique.....	4
3. Les protéines télomériques.....	6
3.1. Formation du télosome.....	6
3.2. Le télosome et le TPE.....	15
3.3. Le télosome et la réparation.....	15
3.4. Le télosome et l'organisation de l'architecture nucléaire....	16
4. Les télomères ne sont pas des cassures double brin mais.....	16
5. Le problème réplcatif terminal.....	19
6. La télomérase.....	22
6.1. La sous-unité catalytique de la télomérase.....	26
6.2. La composante ARN de la télomérase.....	32
6.3. Mécanismes de régulation et de coordination de l'homéostasie de l'élongation des télomères.....	41

7. Les autres solutions au problème réplcatif terminal.....	49
8. États pathologiques associés à la dysfonction du maintien des télomères.....	53
Chapitre I.....	55
Préambule.....	55
Objectif.....	56
Matériel et méthodes.....	57
Résultats.....	59
Chapitre II.....	63
Préambule.....	63
Objectif.....	64
Matériel et méthodes.....	65
Résultats.....	71
Chapitre III.....	79
Préambule.....	79
Objectif.....	81
Résultats additionnels.....	126
Chapitre IV.....	130
Préambule.....	130
Objectif.....	131
Matériel et méthodes.....	132
Résultats.....	139
Chapitre V.....	145

Préambule.....	145
Objectif.....	146
Matériel et méthodes.....	147
Résultats.....	151
Discussion	155
Conclusion	172
Remerciements	177
Références	178
Annexes	209
Principaux plasmides utilisés dans le cadre de cette étude.....	210
Souches de <i>S. cerevisiae</i> utilisées lors de cette étude.....	211
Autorisation de l'éditeur.....	212
Autorisation des co-auteurs.....	213
Manuscrit édité.....	214

FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1:	Représentation schématique de la structure des télomères chez <i>S. cerevisiae</i>	5
Figure 2	Modèles des configurations adoptées par les télomères chez l'humain et la levure.....	11
Figure 3	Le problème réplcatif terminal.....	21
Figure 4	Organisation structurale et fonctionnelle de Est2p.....	29
Figure 5	Cycle d'élongation de la télomérase.....	30
Figure 6	L'analyse phylogénétique comme outil de détermination de la structure secondaire des ARNs.....	35
Figure 7	Organisation structurale et fonctionnelle de l'ARN de la télomérase.....	37
Figure 8:	Changements conformationnels du télosome.....	45
Figure 9:	Modes de génération des survivants en absence de télomérase chez <i>S. cerevisiae</i>	54
Figure 10:	Représentation schématique de divers profils de réplcation en gel 2D d'un chromosome linéaire en fonction de la position de l'origine.....	60
Figure 11:	Schématisation du chromosome linéaire pRW11L.....	62
Figure 12:	Mode de réplcation du chromosome artificiel pRW11L chez le mutant <i>cdc13-2</i>	62
Figure 13:	Effets de la surexpression de Net1p sur le maintien des télomères des souches <i>tlc1 rad52</i>	73
Figure 14:	Génération de survivants dans les souches <i>tlc1 rad52</i>	75

Figure 15:	Maintien des télomères chez les survivants <i>tlc1 rad52</i>	78
Figure 16:	Vérification de la présence de <i>RAD52</i> chez les survivants <i>tlc1 rad52</i>	78
Figure 17:	Arbre phylogénétique de <i>Saccharomyces spp.</i> et des espèces apparentées.....	127
Figure 18:	Analyse des fragments terminaux de restriction (TRFs) chez les espèces de <i>Saccharomyces</i> appartenant au complexe « Senu stricto ».....	129
Figure 19:	Séquences conservées en amont des séquences codantes de l'ARN de la télomérase dans le groupe des « Senu stricto ».....	134
Figure 20:	Aperçu schématique de la région intergénique de <i>PDX3</i> et <i>TLC1</i>	142
Figure 21:	Effets des délétions dans la région promotrice de <i>TLC1</i> sur le maintien des télomères.....	142
Figure 22:	Mutations de substitution dans le putatif pseudonoeud I.....	153
Figure 23:	Contribution de <i>TLC1</i> à l'assemblage, au recrutement et à l'activité de la télomérase.....	174
Tableau 1:	Comparaison de la séquence de la région matrice et des répétitions télomériques correspondantes chez six différentes télomérases.....	3
Tableau 2:	Protéines associées aux télomères chez l'humain et <i>S.</i> <i>cerevisiae</i>	8
Tableau 3:	Protéines associées à l'activité télomérase dans différents organismes.....	25

Tableau 4: Gènes repêchés lors du criblage de la librairie de surexpression génomique pour des survivants <i>tlc1rad52</i>	73
Tableau 5: Oligonucléotides utilisés dans l'étude de la région promotrice de <i>TLC1</i>	136
Tableau 6: Fragments mutants générés par SOE pour l'étude de la région promotrice de <i>TLC1</i>	136
Tableau 7: Survie des souches arborant des délétions de la région promotrice de <i>TLC1</i>	141
Tableau 8: Oligonucléotides utilisés dans l'étude du pseudonoeud I.....	148
Tableau 9: Fragments mutants générés par SOE pour l'étude du pseudonoeud I.....	149

ABRÉVIATIONS

2D	à deux dimensions
5-FOA	acide 5-fluoroorotique
ADNr	ADN ribosomal
ALT	mécanisme supplétif de maintien des télomères
APB	corpuscule promyélocytique associés au ALT
ARS	séquences de réplication autonome
CFP	forme circulaire du plasmide
chIP	immunoprécipitation de la chromatine
CR	région conservée
D-loop	boucle de déplacement
DSB	cassure double brin
ERC	cercle extrachromosomal d'ADNr
kpb	kilo-paires de bases
kD	kilodalton
ME	microscopie électronique
MMS	méthyl méthanesulfonate
NHEJ	raboutage non homologue
nt	nucléotide
OB fold	repliement du site de liaison des oligonucleotides et oligosaccharides
ORC	complexe de reconnaissance de l'origine
ORF	cadre de lecture en phase
pb	paires de bases
PCR	réaction en chaîne de la polymérase

PEV	effet de proximité variable
pol α	ADN polymérase α
RENT	régulateur de l'atténuation nucléolaire et de la télophase
RH	recombinaison homologue
RNP	ribonucléoprotéine
RT	transcriptase inverse
snRNA	ARN nucléolaire de petite taille
snRNP	RNP nucléaire de petite taille
SOE	raboutage d'extensions chevauchantes
SDS	dodécyl sulphate de sodium
TAS	séquences associées aux télomères
TERT	transcriptase inverse de la télomérase
<i>TLC1</i>	gène de l'ARN de la télomérase chez <i>S. cerevisiae</i>
TLC1	composante ARN de la télomérase chez <i>S. cerevisiae</i>
T-loop	boucle télomérique
TMG	triméthylguanosine
TPE	effet de proximité télomérique
TRD	délétion rapide des télomères
TR	ARN de la télomérase
TRF	fragment terminal de restriction
WT	type sauvage
YC	milieu synthétique complet de culture de levure
YP	milieu riche de culture de levure

RÉSUMÉ

Chez la plupart des eucaryotes, les télomères sont constitués de séquences répétitives d'acide déoxyribonucléique (ADN) formant des complexes avec une multitude de protéines. La capacité des séquences télomériques et sous-télomériques à s'associer de façon transitoire et constitutive à diverses protéines confère aux extrémités chromosomiques une structure particulière appelée télosome. Certains complexes présents au télosome sont capables de contrebalancer l'érosion de l'ADN télomérique inhérente aux limitations des ADN polymérases conventionnelles. La télomérase, un des complexes retrouvés au télosome, est une ribonucléoprotéine (RNP) qui utilise un mécanisme de transcription inverse afin de répliquer la toute fin des chromosomes. La composante acide ribonucléique (ARN) de la télomérase est essentielle pour l'assemblage et l'activité catalytique de la RNP. Dans certains types cellulaires et selon l'état physiologique de la cellule, d'autres mécanismes indépendants de la télomérase sont mis à contributions pour compenser efficacement la perte de séquences télomériques. La dysfonction de tous ces mécanismes de maintien de l'homéostasie de la longueur des télomères se manifeste chez l'humain par des situations pathologiques. Dans notre laboratoire, la levure *Saccharomyces cerevisiae* est utilisée comme organisme modèle pour comprendre la structure et la fonction des télomères. La levure est un organisme de choix pour les analyses génétiques et plusieurs aspects de la biologie des télomères sont conservés entre la levure et les humains. Nous avons

avantageusement utilisé *S. cerevisiae* pour l'étude de divers mécanismes de stabilisation des télomères.

Dans une première étude, nous avons voulu confirmer des résultats préliminaires relatifs à un rôle éventuel de la protéine Cdc13p dans l'initiation de la réplication à partir des télomères. Nous avons utilisé une souche de levure dont le gène *CDC13* comporte une mutation qui empêche la protéine de recruter la télomérase aux télomères. Nous avons comparé les profils de réplication en gel à deux dimensions (gel 2D) d'un chromosome artificiel introduit dans une souche sauvage et une souche mutante pour Cdc13p. Les intermédiaires caractéristiques d'une réplication initiée par l'extrémité d'un fragment d'ADN ne sont pas détectables. L'abolition de la fonction de recrutement de Cdc13p n'induit pas de façon notable une réplication aberrante par les extrémités télomériques.

L'éventualité de mécanismes additionnels de maintien des télomères en absence de télomérase et de recombinaison homologue a par la suite été investiguée. Notre approche consistait à altérer le dosage de certains facteurs cellulaires en surexprimant des gènes de levure dans des souches dépourvues des deux mécanismes de maintien des télomères connus à ce jour. Nous avons ainsi isolé six gènes, incluant *NET1*, dont la surexpression abolit la phase de sénescence caractéristique de l'absence de mécanismes de maintien des télomères. Bien que les mécanismes à la base de cette survie accrue ne soient pas encore compris, la recombinaison homologue semble jouer un rôle essentiel dans leur déclenchement.

Nous avons également abordé l'étude de la structure secondaire de l'ARN de la télomérase chez *S. cerevisiae*. La structure secondaire de l'ARN de la télomérase des ciliés et des vertébrés a été déterminée au cours d'études indépendantes grâce à l'analyse phylogénétique et a révélé des éléments structuraux indispensables à l'assemblage et à la fonction de la télomérase. Chez la levure *S. cerevisiae*, bien que quelques éléments de l'ARN de la télomérase (TLC1) aient été caractérisés génétiquement, la structure d'ensemble restait à déterminer. L'approche phylogénétique n'avait pas encore été utilisée chez *S. cerevisiae*, d'une part à cause du nombre limité de séquences homologues disponibles, mais aussi du fait de la taille relativement importante de l'ARN de la télomérase chez cet organisme. Nous avons cloné tous les homologues de TLC1 dans le groupe des *Saccharomyces* « *Sensu stricto* » et déduit un modèle de structure secondaire grâce à l'analyse phylogénétique. La structure secondaire conservée révèle de nouveaux éléments qui constituent des sites potentiels d'association de facteurs impliqués dans la biogénèse et la fonction de la télomérase. La structure proposée offre une vue globale qui permettra d'initier des études subséquentes en vue d'associer les déterminants structuraux de l'ARN à la fonction de la télomérase.

INTRODUCTION

1. Les télomères

Les chromosomes eucaryotes sont des structures nucléaires constituées d'une longue molécule d'ADN linéaire qui, par interactions avec des protéines histones et non-histones, s'organisent en nucléosomes dont la compaction est maximale durant la métaphase (Adkins et al., 2004). La présence de nucléosomes n'est toutefois pas généralisée à tout le chromosome. Certaines régions de l'ADN comportent en effet des séquences spécifiques capables de recruter une multitude de protéines pour constituer des complexes non-nucléosomaux. De telles régions se retrouvent notamment aux télomères, les extrémités physiques des chromosomes (Dandjinou et al., 1999).

Le concept de télomère (τελομερ: étymologiquement du grec telos, extrémité et meros, partie) a pris naissance à la fin des années 1930 suite aux travaux indépendants de Hermann J. Muller et Barbara McClintock. Sur la base d'études cytologiques et génétiques, ces chercheurs ont démontré que les extrémités naturelles des chromosomes linéaires eucaryotes constituent une entité fonctionnelle indépendante jouant un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité physique du chromosome (Muller, 1938; McClintock, 1941). L'avènement de la biologie moléculaire a permis d'établir que chez la plupart des eucaryotes, les télomères sont constitués de séquences spécifiques d'ADN organisés autour d'une variété de protéines.

2. L'ADN aux extrémités des chromosomes

2.1. L'ADN des télomères. L'ADN des télomères est constitué de séquences répétitives simples caractérisées par la présence de nombreux résidus guanosine sur le brin d'ADN allant de 5' à 3' vers l'extrémité du chromosome, le brin G-riche (Tableau 1). Chez les vertébrés et chez *Tetrahymena* ces répétitions sont régulières (respectivement TTAGGG et TTGGGG), alors que chez la levure *S. cerevisiae* elles sont irrégulières ((TG)₁₋₆TG₂₋₃), notamment à cause de leur mode d'incorporation (voir section 6.1). *Drosophila melanogaster*, les insectes diptères *Chironomus* et *Anopheles gambiae*, de même que certaines plantes ne possèdent pas les répétitions télomériques typiques (voir section 7). La longueur des séquences répétitives est très variable d'une espèce à l'autre, atteignant plusieurs milliers de paires de bases (pb) chez les vertébrés, tandis que chez la levure *S. cerevisiae* elle est de 300±75 pb (Shampay et Blackburn, 1988) et d'environ 20 pb seulement chez le cilié *Oxytricha* (Klobutcher et al., 1981). Par contre, au sein d'une même espèce, l'homéostasie de la longueur des répétitions télomériques est étroitement régulée grâce à des mécanismes dédiés (voir sections 6 et 7). Chez la plupart des organismes, le brin G-riche fait saillie à l'extrémité 3' sous forme d'un ADN simple brin. La longueur de cette extension varie selon les espèces. Chez *Homo sapiens*, la taille précise du brin G-riche demeure controversée, mais la plupart des études convergent pour lui assigner une longueur moyenne de 100-200 bases (Wright et al., 1997), ce qui est beaucoup plus important que les 12-14 bases observées chez *S. cerevisiae* en dehors de la phase S (Larrivée et al., 2004). Des données obtenues *in-vitro*

Organismes	Séquence de la matrice (3'-5')	Séquence du brin G-riche (5'-3')	Références
Protozoaire			
<i>Tétrahymena thermophila</i>	AACCCCAAC	T ₂ G ₄	1, 2
Vertébrés			
<i>Homo Sapiens</i>	CAAUCCCAAUC	T ₂ AG ₃	3, 4
<i>Mus musculus</i>	UCCCAAUC	T ₂ AG ₃	5, 6, 7
Levures			
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Indéterminé	T ₁₋₂ ACA ₀₋₁ C ₀₋₁ G ₁₋₆	8
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ACACACACCCACACCAC	(TG) ₁₋₆ TG ₂₋₃	9, 10, 11
<i>Kluyveromyces lactis</i>	AAACUAAUCCAUACACCACAUGCCUAAACU	ACG ₂ AT ₃ GAT ₂ AG ₂ TATGTG ₂ TGT	12, 13

Tableau 1. Comparaison de la séquence de la région matrice et des répétitions télomériques correspondantes chez six différentes télomérases. 1. (Blackburn and Gall 1978; Greider and Blackburn 1989) (Moyzis et al. 1988) (Feng et al. 1995) (Kipling and Cooke 1990) (Starling et al. 1990) (Blasco et al. 1995)

(Sugawara and Szostak 1983) (Shampay et al. 1984) (McEachern and Hicks 1993) (Singer and Gottschling 1994) (McEachern and Blackburn 1994) (McEachern and Blackburn 1995)

montrent que 4 résidus guanosine provenant d'une ou plusieurs molécules d'ADN peuvent, par appariements non-Watson-Crick de type Hoogsteen, former une structure planaire appelée G-quartet, dont l'empilement engendre des conformations inhabituelles de l'ADN (voir synthèse dans Wellinger et Sen, 1997; Neidle et Parkinson, 2003). Bien que l'importance biologique des G-quartets reste à déterminer, plusieurs études suggèrent qu'ils peuvent se former *in-vivo*, aussi bien au sein des répétitions télomériques (Schaffitzel et al., 2001) que dans des séquences non-télomériques (Siddiqui-Jain et al., 2002).

2.2. Les séquences sous-télomériques. En amont des répétitions télomériques, on retrouve fréquemment des séquences d'ADN moyennement répétitives appelées séquences sous-télomériques ou séquences associées aux télomères (Telomere Associated Sequences: TAS). Bien que plusieurs classes de TAS aient été mises en évidence dans les chromosomes humains (Henderson, 1995), c'est chez la levure *S. cerevisiae* que leur étude a été le plus approfondie (Figure 1). On retrouve chez cet organisme essentiellement deux catégories de TAS appelées X et Y' (Chan et Tye, 1983). Les séquences Y' sont hautement conservées et contiennent deux ORFs (Open Reading Frames) chevauchants. On distingue deux classes de séquences Y' dont la longueur est de 6.7 (Y' long) ou 5.2 (Y' court) kilo paires de bases (kpb). Lorsqu'elles sont présentes au télomère, les séquences Y' jouxtent les séquences télomériques et forment des éléments comportant jusqu'à 4 répétitions. Les séquences X, moins conservées, se retrouvent à tous les télomères en un noyau d'au moins 5 répétitions contenant des sites de liaison à la protéine Abf1p. Du fait de l'hétérogénéité de ces

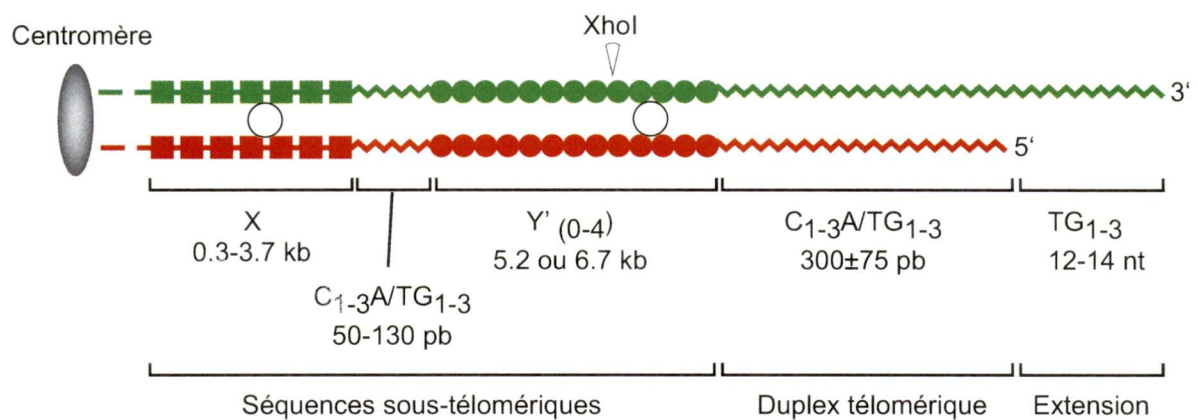


Figure 1. Représentation schématique de la structure des télomères chez *S. cerevisiae* Les extrémités chromosomiques de *S. cerevisiae* sont un composite de séquences répétitives. Une extrémité typique est représentée et n'est pas à l'échelle. Le brin G-riche (vert) fait saillie au-delà du brin C-riche (rouge). En amont des séquences télomériques (zig-zag), se retrouvent les éléments Y' (cercles pleins) et X (carrés). Ces séquences associées contiennent des ARS (cercles vides). Les séquences Y' contiennent un site de restriction pour l'endonuclease *Xho* I permettant de libérer un fragment terminal de restriction (TRF), utilisé pour évaluer la taille des télomères. Dans une souche de type sauvage le TRF est d'environ 1.3 kb. Voir le texte pour une description plus détaillée.

répétitions, la longueur du noyau X peut varier de 0.3 à 3.7 kpb. Entre les répétitions Y' ainsi qu'à la jonction du noyau X et des éléments Y' se trouvent parfois des versions dégénérées de séquences télomériques de vertébrés TTAGGG qui servent de site de liaison à Tbp1p. Le noyau X et les éléments Y' contiennent une ARS (Autonomous Replicating Sequence) capable de s'associer avec l'ORC (Origin Recognition Complex) et peuvent donc servir d'origine de réplication (Pryde et Louis, 1997). La signification structurale et fonctionnelle des séquences X et Y' reste nébuleuse, mais leur présence indique que la recombinaison s'est produite aux télomères (Louis et Haber, 1990; Louis et al., 1994).

3. Les protéines télomériques

3.1. Formation du télosome. La propension des séquences télomériques et sous-télomériques à s'associer de façon transitoire ou constitutive à une variété de protéines confère aux extrémités chromosomiques une structure particulière observée chez plusieurs organismes dont *Tetrahymena thermophila*, *Oxytricha nova*, *S. cerevisiae* et les mammifères (Blackburn et Chiou, 1981; Gottschling et Cech, 1984; Budarf et Blackburn, 1986; Wright et al., 1992; Tommerup et al., 1994). Du fait de sa nature non-nucléosomale, ce complexe nucléoprotéique a été appelé télosome (Wright et al., 1992).

Chez les cellules humaines, la formation et la stabilité du télosome reposent en grande partie sur l'association directe et exclusive de TRF1 et TRF2 (TTAGGG

Repeat-binding Factor 1 et 2) au niveau du duplex télomérique et de POT1 (Protection Of Telomeres) sur l'extension G-riche.

TRF1 a été initialement identifiée à partir de cellules de type HeLa grâce à sa capacité à former exclusivement un complexe avec les séquences répétées en tandem TTAGGG du duplex (Zhong et al., 1992). TRF2 a été découverte sur la base de son homologie avec Tbf1p, une protéine associée aux séquences TTAGGG de la levure (Bilaud et al., 1996; voir section 2.2.). Des études d'immunolocalisation ont par la suite confirmé que TRF1 et TRF2 sont associées au duplex télomérique (Chong et al., 1995; Bilaud et al., 1997; Broccoli et al., 1997). En plus de leur habileté à se lier spécifiquement au duplex télomérique tout au long du cycle cellulaire, ces deux paralogues présentent d'importantes homologies structurales. Ils contiennent une région centrale d'homodimérisation (Bianchi, A. et al., 1997; 1999) et une région C-terminale similaire au domaine de liaison à l'ADN des proto-oncogènes Myb, appelé télobox (Ancelin et al., 1998). TRF1 et TRF2 n'hétérodimérisent pas mais leur homodimérisation est nécessaire à la formation d'un complexe stable avec le duplex d'ADN (Bianchi et al., 1999). Malgré leurs similitudes structurales, TRF1 et TRF2 se distinguent par un domaine N-terminal, respectivement acide et basique. La technique du double-hybride, utilisée conjointement avec diverses méthodes biochimiques de purification a permis d'identifier plusieurs facteurs associés à TRF1 ou à TRF2.

TRF1 et ses protéines associées (TANK1/2-PINX-TIN2-KU70/80; Tableau 2) sont directement impliquées dans la régulation négative de la longueur des télomères. En ce sens, TRF1 serait l'homologue fonctionnel de Rap1p. Lorsque

Organismes	Protéines	Interactions et fonctions	Références
<i>H. sapiens</i>	TRF1/PIN2	(S) duplex (F) site de liaison; régulateur négatif de la longueur des télomères; promotion du t-loop (A) s'associe à la kinase mitotique NIMA; modulation de la polymérisation des microtubules	1, 2
	PINX1	(S) TRF1 (F) régulateur négatif de la longueur des télomères	3
	MCRS2	(S) PINX1 et hTERT (F) régulateur négatif de la longueur des télomères en inhibant hTERT(A) répresseur transcriptionnel (C) exprimée dans une courte fenêtre au début de la phase S	4
	Tankyrase1/2	(S) TRF1 (F) régulateur positif de la longueur des télomères en inhibant TRF1 par ADP-ribosylation; résolution des chromatides sœurs aux télomères; (A) activité PARP	5, 6, 7
	TRF2	(S) duplex (F) site de liaison; protection des télomères contre les fusions bout à bout	8
	hRAP1	(S) TRF2 (F) régulateur négatif de la longueur des télomères (C) orthologue de Rap1p	9, 10
	MRE11/RAD50/NSB1	(S) TRF2 (F) promotion du T-loop	11
	WRN	(S) TRF2 (F) démantèlement du D-loop (A) Activités hélicase et 3'-5' endonucléase	12
	ERCC1/XSF	(S) TRF2 (F) dégrade l'extension 3' des télomères dysfonctionnels (A) endonucléase dirigée vers les structure d'ADN dans le BIR; physiquement associée à hRAD52	13
	TIN2	(S) TRF1, TRF2, PTP(PIP1) (F) régulateur négatif de la longueur des télomères; protection contre la réponse aux dommages; promotion du T-loop/D-loop; modulateur de l'activité PARP de tankyrase1	14, 15
	hPOT1	(S) simple brin et PTP(PIP1) (F) régulateur négatif (controversé) de la longueur des télomères; promotion du D-loop	16, 17
	PTP(PIP1)	(S) POT1 et TIN2 (F) recrutement de POT1 au complexe TRF1; contrôle la longueur des télomères	18, 19
	hnRNPA1/UP1	(S) simple brin et hTR in vitro (F) régulateur positif de la longueur des télomères (A) épissage	20, 21
	KU70/KU80	(S) TRF1 et duplex en phase S? (F) protection des télomères (A) réparation des DSBs par NHEJ	22, 23
	hEST1A/B	(S) hTERT (F) réduit la longueur et la protection des télomères (C) homologues de Est1p	24, 25
<i>S. cerevisiae</i>	Rap1p	(S) duplex (F) complexe protéique; comptage des télomères; régulateur négatif de la longueur des télomères; promotion du TPE (A) répresseur et activateur de la transcription	26; 27
	Rif1p/Rif2p	(S) Rap1p (F) promotion du repliement du télosome; régulateur négatif de la longueur des télomères; Rif1p antagonise Ku70/Sir4p	26, 28, 29, 30
	Sir2p/Sir3p/Sir4p	(S) Rap1p (F) promotion du repliement du télosome (A) extinction moléculaire; activité histone déacétylase de Sir2p; réparation ADN par NHEJ	31, 32, 33
	Ku70/Ku80	(S) simple brin et Sir4p (F) protection des télomères; promotion du repliement du télosome; régulateur positif de la longueur des télomères (A) réparation des DSBs par NHEJ	34, 35, 36
	Cdc13p	(S) simple brin (F) site de liaison; protection des télomères; régulateur positif et négatif de la longueur des télomères; coordination de la réplication des télomères par recrutement différentiel de la télomérase via Est1p et de la primase	37; 38
	Stn1p	(S) Cdc13p et Ten1p (F) protection des télomères; régulateur négatif de la longueur des télomères par antagonisation de Est1p; promotion de la réplication du brin C-riche	39
	Ten1p	(S) Cdc13p et Stn1p (F) contribue à l'action de Stn1p	40

Tableau 2. Protéines associées aux télomères chez l'humain et *S. cerevisiae*. (S) site de liaison; (F) fonction aux télomères; (A) autres fonctions; (C) commentaires.

1. (van Steensel and de Lange 1997); 2. (Griffith et al. 1998); 3. (Zhou and Lu 2001); 4. (Song et al. 2004); 5. (Smith and de Lange 2000); 6. (Kaminker et al. 2001); 7. (Dynek and Smith 2004); 8. (van Steensel et al. 1998); 9. (Li et al. 2000); 10. (O'Connor et al. 2004); 11. (Zhu et al. 2000); 12. (Opresko et al. 2004); 13. (Zhu et al. 2003); 14. (Kim et al. 2004); 15. (Ye et al. 2004a); 16. (Colgin et al. 2003); 17. (Loayza and De Lange 2003); 18. (Ye et al. 2004b); 19. (Liu et al. 2004); 20. (LaBranche et al. 1998); 21. (Fiset and Chabot 2001); 22. (Bailey et al. 1999); 23. (Hsu et al. 2000); 24. (Snow et al. 2003); 25. (Reichenbach et al. 2003); 26. (Li and Lustig 1996); 27. (Marcand et al. 1997); 28. (Hardy et al. 1992); 29. (Wolton and Shore 1997); 30. (Teixeira et al. 2004); 31. (Apancio et al. 1991); 32. (Moretti et al. 1994); 33. (Strahl-Bolsinger et al. 1997); 34. (Tsukamoto et al. 1997); 35. (Gravel et al. 1998); 36. (Grandin et al. 2000); 37. (Pennock et al. 2001); 38. (Chandra et al. 2001); 39. (Grandin et al. 1997); 40. (Grandin et al. 2001b).

TRF1 est ciblée à un télomère artificiel humain, elle inhibe le rallongement des télomères *in cis* (Ancelin et al., 2002). De plus, la surproduction de TRF1 provoque le raccourcissement progressif des télomères dans une lignée cellulaire télomérase positive, alors que la surexpression d'une version de TRF1 incapable de s'associer à l'ADN (TRF1_{ΔDBD}, dominant négatif) conduit à un rallongement des télomères (van Steensel et de Lange, 1997; Smogorzewska et al., 2000). Ces variations de la longueur des télomères se produisent même si la télomérase est active dans les essais *in-vitro*, indiquant que TRF1 est un régulateur de l'accès de la télomérase aux télomères. L'association réduite de la télomérase avec les séquences télomériques lors d'analyses par ChIP renforce la possibilité d'un rôle régulateur de TRF1 (Smogorzewska et al., 2000).

Les phénotypes reliés à la surexpression de TRF2 sont semblables à ceux observés avec TRF1 (Smogorzewska et al., 2000). Cependant la surproduction d'une forme de TRF2 incapable de s'associer à l'ADN (TRF2_{ΔDBD}) se traduit par la perte des extensions G-riche ainsi que par une augmentation marquée des fusions chromosomiques. Cette instabilité n'affecte toutefois pas la longueur des télomères (van Steensel et de Lange, 1997), suggérant que le complexe formé autour de TRF2 (WRN-hRAP1-TIN2-ERCC1/XPF-MRN; voir tableau 2) joue un rôle crucial dans la protection des télomères.

POT1 a été originellement identifié chez l'humain et la levure *Schizosaccharomyces pombe* par homologie avec TEBP, une protéine télomérique retrouvée chez les ciliés tels que *Oxytricha nova*. Ces protéines interagissent avec l'ADN simple brin via un repliement du site de liaison des

oligonucléotides et oligosaccharides (OB-fold: oligonucleotide and oligosaccharide-binding fold; Horvath et al., 1998; Baumann et Cech, 2001; Mitton-Fry et al., 2002). Les études d'immunoprécipitation de la chromatine ont montré que chez l'humain POT1 interagit avec les télomères *in-vivo* et que cette association est corrélée avec la présence d'extensions simple brin. La titration de POT1 suite à la surproduction d'un mutant de POT1 dépourvu de son domaine OB (POT1_{OB}) entraîne une rapide élongation des télomères, ce qui suggère que la présence de POT1 est essentielle pour limiter l'accès de la télomérase. Le mutant POT1_{OB} reste localisé aux télomères, indiquant que POT1 peut également s'associer aux télomères via des protéines télomériques (Loayza et de Lange, 2003). Des données récentes montrent que la localisation télomérique de POT1 résulte d'une double interaction (Figure 2; Tableau 2) d'une part avec PTOP1 (alias PIP1), puis avec l'extension simple brin (Liu et al., 2004; Ye et al., 2004b).

L'analyse en microscopie électronique (ME) de télomères humains incubés en présence de facteurs télomériques puis réticulés au psoralen a permis de proposer un nouveau paradigme pour l'organisation spatiale du télosome. Contrairement au point de vue classique, le télosome ne se termine pas de façon linéaire mais forme plutôt par une structure en boucle de type lasso (Figure 2). Conformément à la nomenclature décrivant les boucles d'acide nucléique observées en ME, cette configuration du télosome a été nommée T-loop/D-loop (Griffith et al., 1999). Bien que les mécanismes de formation du T-loop/D-loop *in-vivo* ne soient pas définitivement établis, un portrait commence à émerger des récentes données. Les complexes formés autour de TRF1 et TRF2 ont de toute

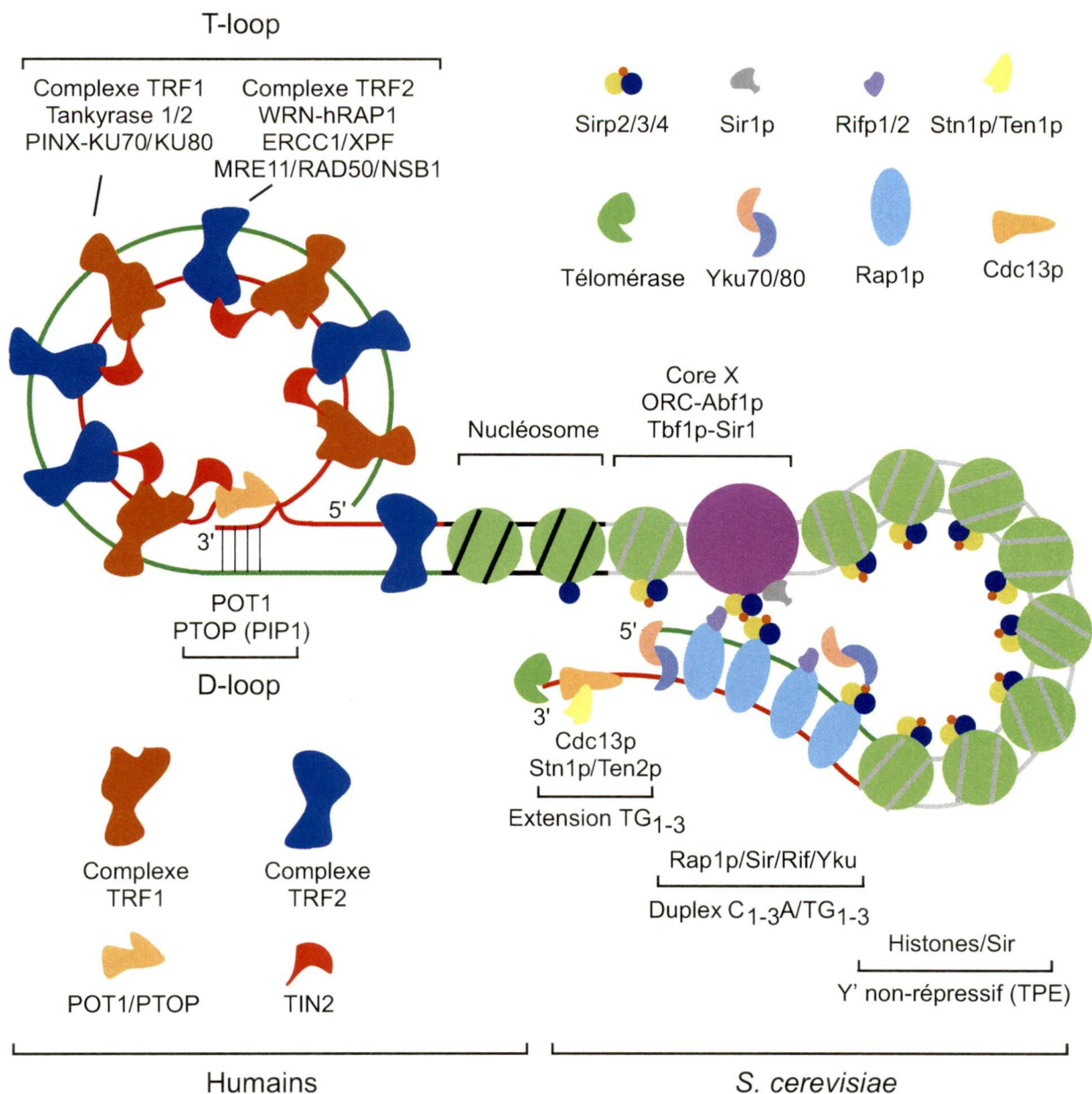


Figure 2. Modèles des configurations adoptées par les télomères chez l'humain et la levure.

Les cellules humaines contiennent 2-30 kb de duplex télomérique et 100-200 nt d'extension simple brin G-riche (ligne rouge) au-delà du brin C-riche (ligne verte). Cette région se termine par une structure en boucle (T-loop) formée par insertion de l'extension G-riche dans le duplex d'ADN, créant un brin déplacé (D-loop). La toute fin de l'extension G-riche a été appariée au brin C-riche, mais pourrait être simple brin. Les télomères de levure adoptent plutôt une structure repliée sur les séquences sous-télomériques X (ligne grise) de façon à former une région hétérochromatique répressive d'environ 3-4 kb dont est exclue la région Y'. Voir le texte pour une description plus détaillée.

évidence des fonctions télomériques différentes (voir tableau 2). De plus, l'incapacité de TRF1 et TRF2 à hétérodimériser se traduit en principe par la présence aux télomères de deux complexes distincts (Figure 2; Tableau 2). Cependant, cette dichotomie fonctionnelle n'est pas absolue. TIN2 a récemment émergé comme une protéine centrale pour la cohésion du télosome. TIN2 peut s'associer à TRF1 et TRF2 de façon indépendante et simultanée. TIN2 interagit également avec PTP1 (PIP1) qui recrute à son tour POT1 aux télomères (Loayza et de Lange, 2003; Ye et al., 2004b). Par ses multiples interactions, TIN2 rapproche les trois principales protéines associées aux télomères (Kim et al., 2004; Ye et al., 2004a). La réticulation induite par TIN2 permet vraisemblablement à TRF2 d'ériger le T-loop (Bianchi et al., 1999), ce qui facilite la stabilisation du D-loop par POT1 (Smogorzewska et al., 2000; Baumann et Cech, 2001) et contribue à limiter l'accès à la télomérase. De plus, la dysfonction de TIN2 déclenche les mécanismes de réponse aux dommages, indiquant que les complexes constitués par TIN2 sont également importants pour la protection des télomères (Kim et al., 2004).

La configuration du télosome en T-loop/D-loop a été observée chez d'autres espèces de mammifères, dont la souris et le poulet, ainsi que chez *Oxytricha fallax* et chez *Trypanosoma brucei* (Griffith et al., 1999; Murti et Prescott, 1999; Munoz-Jordan et al., 2001; Nikitina et Woodcock, 2004).

Chez la levure *S. cerevisiae*, une configuration du type T-loop/D-loop a été proposée comme intermédiaire dans le processus de délétion rapide qui survient lorsque les télomères sont excessivement longs (TRD: Telomere Rapid Deletion;

Lustig, 2003). Les limites inhérentes à la technique utilisée pour visualiser le T-loop/D-loop empêchent l'examen direct du télosome chez la levure. Cependant, la formation de T-loop/D-loop chez cet organisme est vraisemblablement transitoire, dans la mesure où la petite taille des télomères (300 pb) engendrerait de petites boucles, très instables stériquement. Plusieurs travaux suggèrent que le télosome chez la levure pourrait néanmoins se former par le repliement des séquences télomériques sur les séquences sous-télomériques, de façon à ériger une structure d'où sont exclues l'extension G-riche et les séquences Y' (Strahl-Bolsinger et al., 1997; Pryde et Louis, 1999; de Bruin et al., 2000b; de Bruin et al., 2001; Zaman et al., 2002; Figure 2). Les données génétiques indiquent que chez la levure l'hétérochromatine télomérique est assemblée au sein d'un ensemble complexe d'interactions protéiques homotypiques et hétérotypiques centrées autour des facteurs Rap1p (Repressor/activator-site binding protein 1) et Cdc13p, respectivement associées au duplex télomérique et à l'extension simple brin (Figure 2; Tableau 2).

Rap1p est une protéine essentielle participant à une multitude de processus cellulaires chez la levure (Shore, 1994). Rap1p a été identifiée à la fois comme répresseur et activateur de la transcription (Huet et Sentenac, 1987; Shore et Nasmyth, 1987) et s'associe à plusieurs loci génomiques dont les loci régulant le mating type, *HML* et *HMR* (Shore et Nasmyth, 1987; Buchman et al., 1988). Des études d'immunofluorescence ont montré que Rap1p est la constituante protéique prédominante au télosome (Klein et al., 1992) où elle s'associe aux répétitions télomériques (Conrad et al., 1990; Wright et Zakian, 1995) et sous-télomériques

(Strahl-Bolsinger et al., 1997). Une série d'expériences réalisées *in-vitro* et *in-vivo* ont montré que Rap1p peut recruter directement ou indirectement une variété de facteurs (Rifp1/2-Sir2/3/4-Yku70/80; voir Figure 2 et Tableau 2).

Contrairement aux régions télomériques, la chromatine sous-télomérique a une organisation nucléosomale typique (Wright et al., 1992). Les queues N-terminales des histones H3 et H4 sous-télomériques sont hypoacétylées comparativement aux histones présentes dans le reste du génome (Braunstein et al., 1993; Monson et al., 1997; de Bruin et al., 2000b) et recrutent les protéines Sir2p, Sir3p et Sir4p (Hecht et al., 1996; Strahl-Bolsinger et al., 1997), ainsi que des protéines spécifiquement associées à l'ADN du noyau X, en l'occurrence ORC, Abf1p, Tbf1p et Sir1p (Pryde et Louis, 1999).

CDC13 (Cell Division Cycle) a été initialement identifié comme un gène essentiel à la progression du cycle cellulaire (Hartwell, 1974) puis caractérisé grâce à l'analyse d'un mutant thermosensible, *cdc13-1* (Garvik et al., 1995). Chez le mutant *cdc13-1*, on note une augmentation de la recombinaison dans les régions sous-télomériques à température semi-restrictive, et une accumulation d'ADN télomérique simple-brin à température restrictive (Garvik et al., 1995), suggérant que Cdc13p s'associe avec l'extension simple brin télomérique. Cette possibilité a été ensuite confirmée par la très grande affinité de Cdc13p pour l'extension simple brin télomérique (Lin et Zakian, 1996; Nugent et al., 1996). Par double hybride, la région N-terminale de Cdc13p interagit également avec l'ADN polymérase α ($\text{pol}\alpha$), et Est1p une sous-unité de la télomérase (Qi et Zakian, 2000). Cdc13p forme également un complexe avec d'autres partenaires comme

Stn1p, Ten1p (Grandin et al., 1997; Grandin et al., 2001b). L'association de Stm1p à Cdc13p demeure controversée (Hayashi et Reddel, 2002; Van Dyke et al., 2004).

3.2. Le télosome et le TPE. La répression des événements génétiques à proximité des régions hétérochromatiques a été initialement mise en évidence chez la mouche à fruit *Drosophila melanogaster*, et appelée effet de proximité variable (PEV: position effect variegation; synthèse dans Weiler et Wakimoto, 1995). Des phénomènes similaires ont été observés à divers loci du génome de la levure *S. cerevisiae*, notamment au voisinage des télomères où l'on parle alors d'effet de proximité aux télomères (TPE: Telomere Position Effect; Gottschling et al., 1990). Le TPE pourrait jouer un rôle dans la régulation d'une minorité de gènes (Vega-Palas et al., 1997; Wyrick et al., 1999; Vega-Palas et al., 2000). L'ancrage périnucléaire du télosome (voir section 3.4), en maintenant une forte concentration des protéines structurales du télosome, pourrait contribuer à l'établissement du TPE ou simplement en être une conséquence (Taddei et Gasser, 2004). Le TPE est donc une manifestation de la structure particulière du télosome, et la mesure de l'atténuation transcriptionnelle au voisinage des télomères fournit une indication de l'intégrité du télosome. Les phénomènes apparentés au TPE s'observent également dans les régions sous-télomériques des chromosomes chez les parasites protozoaires *Trypanosoma brucei* et *Plasmodium falciparum* (Rudenko et al., 1998; Scherf et al., 1998).

3.3. Le télosome et la réparation. Les données accumulées contribuent à un modèle selon lequel le télosome constitue un réservoir pour la mobilisation rapide

des protéines du complexe Sir et Yku vers les sites de dommage d'ADN (Haber, 1999). La relocalisation programmée des protéines Sir des télomères vers le nucléole semble également contribuer à la protection de l'ADN ribosomal ainsi qu'au phénomène de vieillissement des levures (Kaeberlein et al., 1999; Tissenbaum et Guarente, 2001).

3.4. Le télosome et l'organisation de l'architecture nucléaire. Chez la levure *S. cerevisiae*, les 32 télomères s'agrègent à la périphérie du noyau par groupes de 8 à 10, formant des sous-compartiments télosomaux (Gotta et Gasser, 1996; Gotta et al., 1997; Laroche et al., 1998) qui rappellent l'orientation dite de « Rabl » (Rabl, 1885). Cette localisation périnucléaire du télosome dépend du complexe Yku70/Yku80, des protéines Sir, mais aussi de Mlp1p et Mlp2p, des nucléoporines associées aux pores nucléaires (Galy et al., 2000).

4. Les télomères ne sont pas des cassures double brin mais...

Les cassures double brin (Double Strand Brake: DSB) au sein de l'ADN sont des lésions génomiques générées au cours de processus biologiques ou suite aux effets d'agents exogènes. À titre d'exemple, les contraintes mécaniques imposées au chromosome lors du mouvement de la fourche de réplication, de même que l'action des radiations ionisantes, des mutagènes chimiques, des rayons ultraviolets ou l'intégration rétrovirale sont susceptibles de causer des DSBs. Ces dommages de l'ADN sont détectés par les systèmes de surveillance cellulaires (checkpoint) qui commandent alors un arrêt du cycle cellulaire afin d'effectuer les réparations qui s'imposent (synthèse dans Melo et Toczyski, 2002).

Si elles ne sont pas résolues, ces lésions peuvent être létales pour la cellule. Les deux voies de réparation des DSBs chez les eucaryotes sont le raboutage non-homologue (Non-Homologous End-Joining: NHEJ) et la recombinaison homologue (RH); synthèse dans Paques et Haber, 1999).

Le NHEJ répare des extrémités d'ADN adjacentes ayant peu ou pas d'homologie de séquence, alors que la RH est plus précise et nécessite une matrice intacte d'une séquence homologue, soit sur un chromosome homologue ou sur une chromatide sœur. Chez la levure *S. cerevisiae*, les gènes participant à la RH englobent les produits du groupe épistatique de *RAD52* (*RAD50*, *RAD51*, *RAD52*, *RAD54*, *RAD55*, *RAD57*, *RAD59*, *RDH54/TID1*, *MRE11*, et *XRS2*) et ceux du NHEJ impliquent les fonctions d'au moins une dizaine de gènes, incluant *YKU70*, *YKU80*, *DNL4*, *LIF1*, *SIR2*, *SIR3*, *SIR4*, *RAD50*, *MRE11*, et *XRS2*. Ces gènes sont conservés de la levure aux vertébrés (Sung et al., 2000; Lewis et Resnick, 2000), mais les attributions de ces deux voies de réparation des DSB diffèrent radicalement entre les deux groupes d'organismes (Liang et al., 1998; Paques et Haber, 1999). L'ADN télomérique dépourvu de toute protection pourrait, du fait de sa position terminale, être reconnu comme une DSB, avec des incidences graves pour la cellule. Cependant, les conséquences moléculaires de la dysfonction du télomère varient selon les organismes.

Chez *S. cerevisiae*, les télomères déprotégés présentent des extrémités franches ou des extensions 3' suite à dégradation du brin 5' (Garvik et al., 1995; Lydall et Weinert, 1995; Pang et al., 2003). Ces structures sont détectées par les systèmes de surveillance des dommages à l'ADN contrôlés par le gène *RAD9*.

Rad9p, qui est phosphorylée durant la progression normale du cycle cellulaire, devient hyperphosphorylée suite à la détection d'un dommage et commande un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (Weinert et Hartwell, 1990; Vialard et al., 1998; Emili, 1998). Cependant, la plupart des cellules arrêtées suite à un dommage peuvent à nouveau rentrer en mitose après avoir fusionné les télomères déprotégés par la voie du NHEJ. Contrairement à son rôle dans la réparation des DSBs, le NHEJ favorise le raboutage des télomères et conduit à la formation de chromosomes dicentriques. La répétition des événements de fusion-cassure à chaque ronde de division entraîne la perte du chromosome (Sandell et Zakian, 1993; Hackett et al., 2001). Chez *S. pombe*, l'absence de protection aux télomères se traduit également par une instabilité génétique et la sénescence. Cependant une sous-population des cellules arrive à réchapper de la sénescence lorsque les événements délétères de fusion chromosomale arrivent à produire des chromosomes circulaires (Nakamura et al., 1998; Naito et al., 1998). L'érection du télosome permet donc aux cellules de distinguer l'extrémité des chromosomes intacts de chromosomes endommagés et contribue à la stabilité génétique.

À l'instar de la levure, la dysfonction des télomères chez les mammifères s'apparente aux dommages à l'ADN. Lorsque les télomères perdent leur protection, les extrémités franches générées par l'érosion de l'extension G-riche déclenchent une cascade apoptotique en phase G1, suite à l'induction de p53 et p21 et la réduction du niveau de phosphorylation de pRb (van Steensel et al., 1998; Smogorzewska et de Lange, 2002; Espejel et Blasco, 2002). Ces télomères deviennent alors la cible du NHEJ, ce qui se traduit par la formation de

chromosomes dicentriques et multicentriques ainsi que par l'aneuploïdie (Blasco et al., 1997b; van Steensel et al., 1998; Bailey et al., 2001; Bailey et al., 2004b). Ces observations montrent bien que les facteurs associés aux séquences télomériques contribuent à ériger une structure qui empêche d'alerter les mécanismes de contrôle des dommages à l'ADN, possiblement en camouflant l'extension G-riche.

Malgré les différences structurales et fonctionnelles nettes entre les télomères et les DSBs, les données accumulées montrent que le maintien des télomères est influencé par des facteurs participant à la réparation des DSBs, suggérant que dans une étroite fenêtre de la réplication, les télomères pourraient ressembler à une DSB. Chez *S. cerevisiae*, ces facteurs incluent l'hétérodimère Yku70/Yku80, le complexe Mre11/Rad50/Xrs2 (également désigné MRX; voir section 3.1) et les composantes de la voie de signalisation TEL1/MEC1 (Ritchie et Petes, 2000).

5. Le problème réplcatif terminal

Les ADN polymérases conventionnelles ne peuvent initier la synthèse *de novo* et se servent d'une amorce exogène d'ARN simple brin pour synthétiser l'ADN dans la direction 5' vers 3' (Figure 3). La synthèse du brin avancé utilise le brin parental C-riche comme matrice et se déroule, en principe, de façon continue pour générer un fragment d'ADN avec une extrémité franche. Comme l'extrémité 5' du brin C-riche de l'ADN parental est en retrait par rapport au brin G-riche, l'ADN nouvellement produit se retrouve raccourci d'une longueur correspondant à la taille de l'extension 3' du brin parental complémentaire initial. Le brin retardé,

par contre, est synthétisé de façon discontinue sous forme de fragments d'Okazaki. Suite au retrait des amorces d'ARN, les fragments d'Okazaki sont raboutés par extension et ligation, laissant à l'extrémité 5' du brin néo-formé un segment d'ADN non répliqué d'au moins 8 à 12 nucléotides, correspondant à la distance entre l'extrémité 3' de l'amorce distale au centromère et l'extrémité 3' du brin répliqué. Le raccourcissement de l'extrémité 5' du brin retardé télomérique génère les extensions G-riche servant de substrats à la télomérase pour le rallongement subséquent (voir section 6.3.2). En revanche, la réplication incomplète des deux extrémités chromosomiques pose un problème potentiel à la cellule puisque, en l'absence de mécanismes compensatoires, la récurrence du phénomène à chaque cycle cellulaire se traduit par une réduction nette de la taille des télomères (Watson, 1972; Olovnikov, 1973). Chez certains eucaryotes comme la levure, la perte de séquences terminales se produit à un rythme de ~4 à 6 paires de bases par télomère à chaque division cellulaire (Lundblad et Szostak, 1989). Dans certaines lignées cellulaires humaines ou de souris, la perte de segments qui se produit à raison de 50 à 150 paires de bases par extrémité lors de chaque ronde de division (Niida et al., 1998; Blasco et al., 1997a; Harley et al., 1990) est plus importante que prévu, suggérant une réplication incomplète et/ou la présence d'activités de dégradation aux télomères (voir section 6.3.2).

Le problème réplcatif terminal, initialement énoncé sur des bases théoriques, a pu être reconstitué avec succès *in-vitro* dans un système viral (Ohki et al., 2001). La perte de séquences qui résulte du problème réplcatif constituerait une horloge moléculaire dont le compte à rebours sert à limiter le nombre de

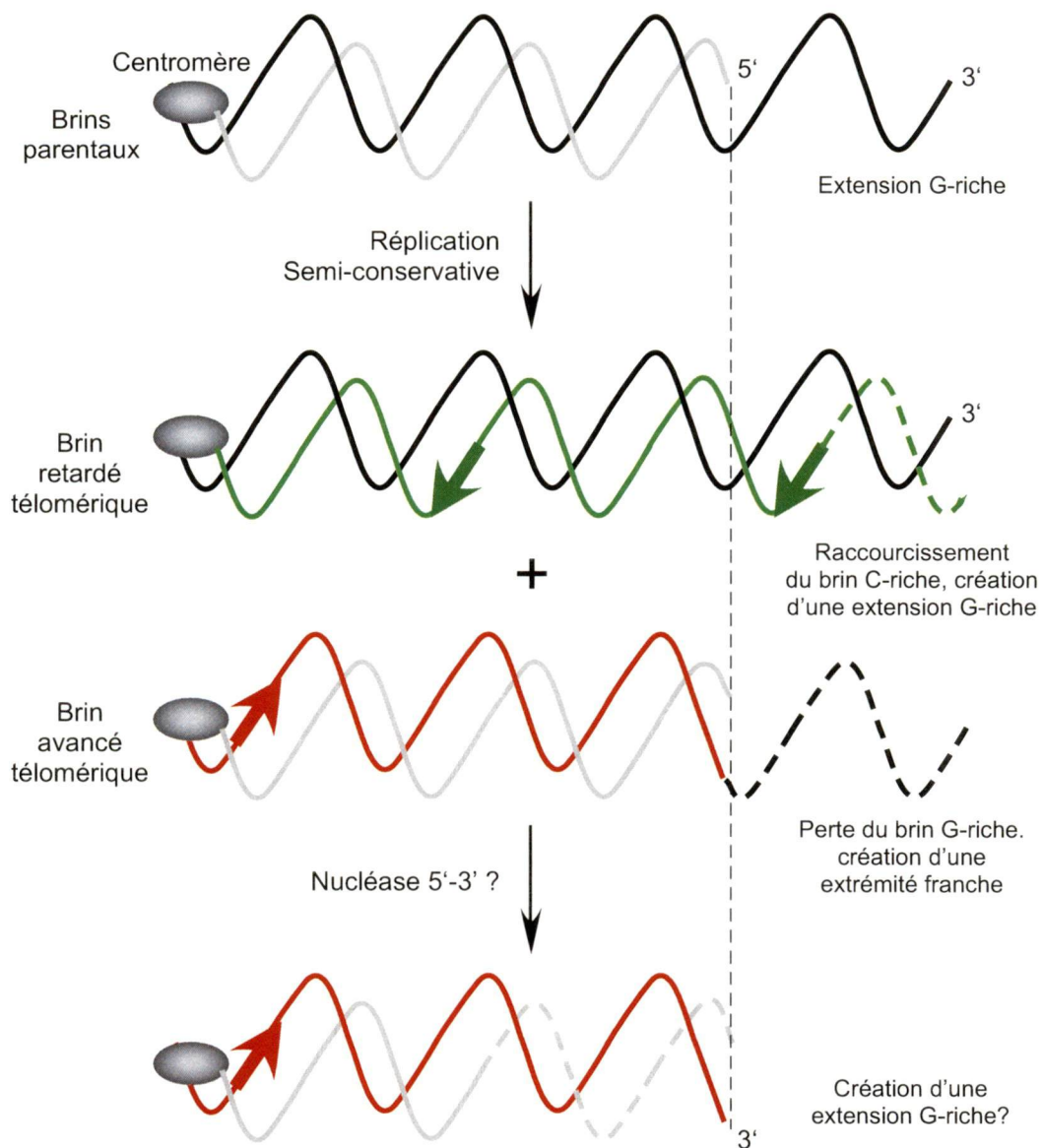


Figure 3. Le problème réplcatif terminal. La réplication conventionnelle de l'ADN génère deux extrémités chromosomiques asymétriques. La réplication du brin avancé (rouge) se déroule d'un seul trait jusqu'à l'extrémité 3' du brin parental et produit une extrémité franche, qui pourrait être transformée en extension 3' par l'action d'une hypothétique nucléase 5'->3'. Par contre, la réplication du brin retardé (vert) se fait de façon discontinue et génère une extension 3' suite aux effets combinés de l'absence d'activité primase à l'extrême fin et du retrait de l'amorce (flèche) distale au centromère. S'il n'existe aucun mécanisme compensatoire, le chromosome raccourcira (lignes en pointillé) à chaque ronde de réplication. Voir le texte pour une description plus détaillée.

divisions des cellules somatiques humaines normales (Harley et al., 1992; Wright et Shay 1992). Par contre, certaines lignées cellulaires humaines (cellules germinales, embryonnaires, et la plupart des cellules cancéreuses) ont conservé ou réactivé différents mécanismes pour résoudre le problème réplcatif terminal et maintenir leur capacité à proliférer indéfiniment (synthèse dans Janknecht, 2004).

6. La télomérase

Plusieurs solutions ont été développées par les organismes pour contrecarrer les effets du problème réplcatif terminal. La plus répandue est fournie par la télomérase, une polymérase d'ADN exclusivement dédiée à la réplication des télomères. Cette enzyme, initialement identifiée par voie biochimique chez le cilié *Tetrahymena thermophila* (Greider et Blackburn, 1985) et par la suite chez d'autres espèces (Zahler et Prescott, 1988; Morin, 1989; Shippen-Lentz et Blackburn, 1989), utilise un mécanisme original de synthèse *de novo* de l'ADN reposant sur une sous-unité catalytique hautement conservée appelée TERT (TElomerase Reverse Transcriptase). L'absence d'activité télomérase suite au traitement à la ribonucléase A suggérait qu'une molécule d'ARN endogène serve de matrice pour ajouter des séquences télomériques. Cette hypothèse s'est par la suite avérée grâce à l'identification de la composante ARN de la télomérase chez *Tetrahymena* (Greider et Blackburn, 1987; Greider et Blackburn, 1989). Au sein de cet ARN, appelé TR (Telomerase RNA), la présence d'un segment servant de matrice a été également confirmée du fait de la complémentarité des séquences

télomériques correspondantes (Greider et Blackburn, 1989; Shippen-Lentz et Blackburn, 1990; Singer et Gottschling, 1994).

Les organismes unicellulaires comme les ciliés et la levure expriment la télomérase de façon constitutive et leurs télomères sont maintenus à une taille médiane constante au cours du cycle cellulaire. Chez la levure *S. cerevisiae*, les facteurs impliqués dans la voie de la télomérase ont été initialement identifiés grâce à des approches génétiques indépendantes basées sur l'incapacité de souches mutantes à maintenir de façon stable un chromosome artificiel, c'est-à-dire un plasmide linéaire ayant des répétitions télomériques aux extrémités (Lundblad et Szostak, 1989; Lendvay et al., 1996). Dans une souche de levure dépourvue d'activité télomérase, l'ADN télomérique s'érode graduellement (~5 paires de base par génération) et ce phénomène s'accompagne d'un déclin progressif de la population de cellules sur 60 à 70 générations appelé sénescence répllicative. Plusieurs études indépendantes ont permis d'identifier, parfois de façon fortuite, les gènes dont la mutation conduit à ce phénotype de mort différée. Ces études ont ainsi contribué à la découverte de gènes de la voie de la télomérase (Tableau 3): *TLC1* (TElomerase Component 1), *EST1*, *EST2* et *EST3* (Ever Shorter Telomeres; Lundblad et Szostak, 1989; Lendvay et al., 1996; Singer et Gottschling, 1994). Des expériences de co-immunoprécipitation ont confirmé que les produits de ces gènes fonctionnent au sein d'une holoenzyme (Lin et Zakian, 1995; Steiner et al., 1996; Lingner et al., 1997a). Des extraits préparés à partir de souches comportant des mutations dans *EST2* et *TLC1* perdent l'activité télomérase dans les essais *in-vitro* (Cohn et Blackburn, 1995; Counter et al., 1997;

Lingner et al., 1997a; Lingner et al., 1997b). Par contre, les extraits provenant de souches ayant des mutations dans *EST1* et *EST3* retiennent l'activité de l'enzyme. Ces résultats ont permis de proposer que *EST2* et *TLC1*, qui encodent respectivement la sous-unité catalytique et l'ARN de la télomérase, constituent le noyau catalytique de la RNP (Counter et al., 1997; Singer et Gottschling, 1994) alors que *EST1* et *EST3* encodent vraisemblablement des protéines accessoires *in-vitro*. L'association de Est1p et Est3p à la télomérase pourrait cependant lui conférer des propriétés additionnelles *in-vivo*. Il a été montré que Est1p et Est2p interagissent directement avec des éléments structuraux de l'ARN de *TLC1* (TLC1), tandis que l'association de Est3p à TLC1 semble dépendre de la présence préalable de Est2p sur l'ARN (Hughes et al., 2000a; Livengood et al., 2002; Zhou et al., 2000; Seto et al., 2002; Friedman et al., 2003).

Chez les organismes pluricellulaires comme l'humain, l'expression de l'activité télomérase n'est pas constitutive, mais étroitement régulée. Bien que restreinte aux cellules germinales et aux cellules souches l'action de la télomérase est faiblement détectable dans les cellules somatiques. La régulation de l'activité télomérase résulte essentiellement de la répression transcriptionnelle du gène hTERT dans les cellules somatiques et plusieurs gènes impliqués dans la tumorigenèse dont la voie Mad/Myc y contribuent (Ducrest et al., 2002; Janknecht 2004). *In-vitro*, l'activité enzymatique basale de la télomérase peut être reconstituée dans les lysats de réticulocytes de lapin rien qu'en co-exprimant hTERT et hTR. Cependant, la reconstitution *in-vitro* occulte le fait que d'autres facteurs, déjà présents dans les lysats de réticulocytes de lapin, sont nécessaires

Organismes	Protéines	Interactions et fonctions	Références
<i>T. thermophyla</i>	p80/p95	(S) tTR (F) affecte la longueur des télomères	1, 2
<i>H. sapiens</i>	TEP1	(S) hTERT et hTR (F) inconnue aux télomères (A) stabilité des ARNs Vault	3, 4
	p23/p90	(S) hTERT (F) assemblage télomérase (A) chaperone, foldasome	5
	Dyskérine/NAP57	(S) hTR via H/ACA (A) hypothétique pseudourine synthase impliquée dans la maturation des snoRNPs	6, 7
	hGAR1	(S) hTR via H/ACA (A) maturation des snoRNPs	6, 8
	hNOP10	(S) hTR via H/ACA	9
	hNHP2	(S) hTR via H/ACA (A) maturation des snoRNPs	8
	hnRNPC1/C2	(S) hTR (F) longueur des télomères	10
	hnRNPA1/UP1	(S) hTR et aux télomères (F) régulateur positif de la longueur des télomères (A) épissage	11, 12
	La	(S) hTR (F) longueur des télomères (A) transport nucléocytoplasmique	13
	hStau	(S) hTR	14
	L22	(S) hTR (A) composante du ribosome	14
	14-3-3	(S) hTERT (F) localisation nucléaire de hTERT	15
	hEST1A/B	(S) hTERT (F) affecte la longueur et la protection des télomères (C) homologues de Est1p	16, 17
<i>S. cerevisiae</i>	Est1p	(S) TLC1 et simple brin (F) promotion de l'activité télomérase, inutile in vitro	18, 19
	Est3p	(S) Est2p (F) inconnue, inutile in vitro	20
	Ku70/Ku80	(S) TLC1 (F) accès télomérase (A) réparation des DSBs par NHEJ	21, 22
	Protéines Sm	(S) TLC1 (F) stabilité de TLC1 (A) maturation des ARNs	23
	Mtr10p	(F) Maturation de TLC1 (A) transport nucléocytoplasmique	24

Tableau 3. Protéines associées à l'activité télomérase dans différents organismes. (S) site de liaison; (F) fonction aux télomères; (A) autres fonctions; (C) commentaires. 1. (Miller and Collins 2000) 2. (Gandhi and Collins 1998) 3. (Harrington et al. 1997a) 4. (Beattie et al. 2000) 5. (Holt et al. 1999) 6. (Dragon et al. 2000) 7. (Mitchell et al. 1999b); 8. (Pogacic et al. 2000); 9. (Mitchell and Collins 2000); 10. (Ford et al. 2000); 11. (LaBranche et al. 1998); 12. (Fiset and Chabot 2001); 13. (Ford et al. 2001); 14. (Le et al. 2000); 15. (Seimiya et al. 2000); 16. (Snow et al. 2003); 17. (Reichenbach et al. 2003); 18. (Taggart et al. 2002); 19. (Evans and Lundblad 2002); 20. (Hughes et al. 2000a); 21. (Stellwagen et al. 2003); 22. (Peterson et al. 2001); 23. (Seto et al. 1999); 24. (Ferrezzuelo et al. 2002).

à l'assemblage d'un complexe enzymatique actif *in-vivo* (Weinrich et al., 1997). Des études aussi bien biochimiques que génétiques ont effectivement permis de découvrir des facteurs additionnels interagissant directement ou indirectement avec hTERT ou hTR pour former la RNP (Tableau 3). Bien que certaines composantes participent à la catalyse, la biogénèse, la stabilité, et l'assemblage de la télomérase, l'importance fonctionnelle de plusieurs interactions reste à déterminer. De plus, on ignore si les facteurs identifiés à ce jour se retrouvent au sein d'une RNP commune ou font partie de structures distinctes présentes à différents stades du processus d'assemblage. La diversité des facteurs associés à la télomérase, telle qu'observée d'un organisme à l'autre, contraste avec la forte conservation évolutionniste des motifs structuraux au sein de TERT et TER.

6.1. La sous-unité catalytique de la télomérase. La mise au point d'un essai télomérase *in-vitro* lors de l'identification initiale de la télomérase chez *Tetrahymena thermophila* a été déterminante pour mettre en évidence l'activité télomérase dans une variété d'organismes tels que les autres ciliés (Zahler et al., 1991; Shippen-Lentz et Blackburn, 1989), les humains (Morin, 1989; Kim et al., 1994), la souris (Prowse et al., 1993), la levure (Cohn et Blackburn, 1995), la grenouille (Mantell et Greider, 1994) et les plantes (Fitzgerald et al., 1996). La disponibilité de cet essai enzymatique a également facilité la purification de la première TERT chez *Euplotes aediculatus*, en l'occurrence la protéine p123 (Lingner et Cech, 1996). Les comparaisons de séquences ont révélé que p123, qui contient des motifs caractéristiques des transcriptases inverse, présente des homologies avec Est2p, une protéine indispensable au maintien des télomères

chez *S. cerevisiae*, précédemment identifiée lors d'un criblage génétique (Lendvay et al., 1996). L'introduction de mutations dans le domaine transcriptase inverse de Est2p conduit au raccourcissement des télomères et à la sénescence répliative, indiquant que cette région est importante pour la catalyse du rallongement des télomères *in-vivo* (Counter et al., 1997). L'analyse comparative de séquences avec les motifs transcriptase inverse de p123 a permis de découvrir plusieurs homologues de TERT, notamment chez l'humain (Harrington et al., 1997b; Kilian et al., 1997; Meyerson et al., 1997; Nakamura et al., 1997). Les motifs transcriptase inverse des TERTs provenant de divers organismes sont phylogénétiquement apparentés aux autres transcriptases inverse, notamment au niveau de trois résidus aspartate (triade catalytique) indispensables à la catalyse (Nakamura et al., 1997; Eickbush, 1997). Cependant, la présence de domaines exclusifs aux TERTs montrent qu'ils forment un sous-groupe distinct (Lingner et al., 1997b). Chez *S. cerevisiae*, Est2p peut être grossièrement divisée en quatre domaines (Figure 4): (1) un domaine N-terminal dont la plupart des résidus sont superflus pour l'activité *in-vitro* et contenant un motif essentiel à la liaison à Est3p et à la liaison à l'ADN (Friedman et Cech, 1999; Friedman et al., 2003; Xia et al., 2000); (2) un domaine exclusif aux TERTs contribuant à l'interaction avec une portion centrale essentielle de TLC1 (Livengood et al., 2002; Friedman et Cech, 1999); (3) un domaine transcriptase inverse comportant des motifs catalytiques conservés (synthèse: O'Reilly et al., 1999), et (4) un domaine C-terminal peu conservé mais important pour la processivité (Peng et al., 2001).

Bien que le mécanisme réactionnel de la télomérase ne soit pas complètement établi à ce jour, on peut diviser le cycle d'addition d'une répétition en trois étapes (Figure 5): (1) la reconnaissance du substrat: cette étape se fait par complémentarité entre la portion 3' de la matrice et les séquences situées à l'extrémité 3' de l'extension G-riche. Des résidus d'un potentiel site d'ancrage de TERT pourraient contribuer à la reconnaissance du substrat; (2) l'élongation: cette étape se déroule en deux phases comprenant l'incorporation d'un nucléotide au site actif de l'enzyme suivie de la libération du site actif par décalage simultané du duplex ARN-ADN. Ce mouvement, appelé translocation de nucléotides ou processivité de type I, se répète en principe jusqu'à ce que la répétition soit entièrement copiée. L'élongation d'une répétition peut cependant ne pas atteindre son terme suite à la dissociation prématurée de l'enzyme ou à son blocage (stalling); (3) la terminaison ou le ré-engagement: après l'ajout d'une répétition, l'enzyme peut mettre fin au cycle d'élongation en se dissociant ou en s'immobilisant, ou encore réitérer un autre cycle d'addition de répétition. Dans ce dernier cas, la matrice dégage alors son extrémité 5' de l'extrémité 3' de l'ADN néo-formé et y ré-aligne son extrémité 3' sans se dissocier. Ce glissement de la matrice par rapport à l'ADN télomérique est appelé addition de répétition ou processivité de type II (Bosoy et Lue, 2004).

In-vitro, les télomérases humaines et de ciliés possèdent les deux types de processivité (Morin, 1989; Prowse et al., 1993; Greider, 1991) alors que la télomérase de *S. cerevisiae* arbore une cinétique de premier ordre puisqu'elle reste associée de façon stable à son substrat d'ADN (Cohn et Blackburn, 1995;

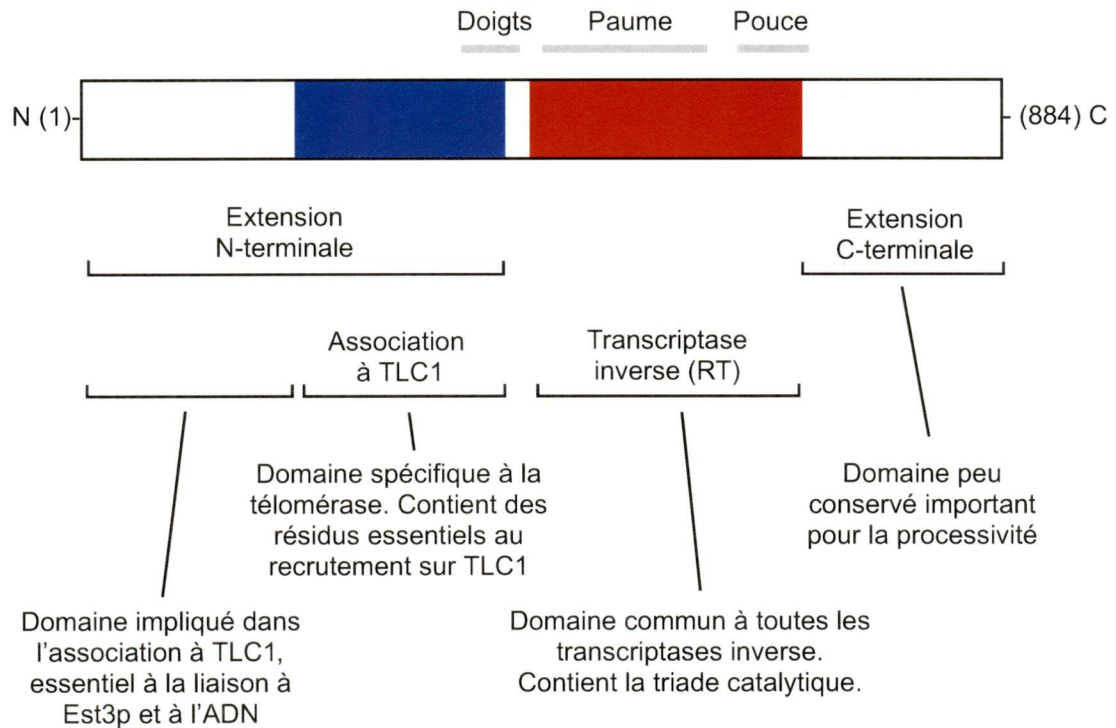


Figure 4. Organisation structurale et fonctionnelle de Est2p. Les régions impliquées dans divers aspects de la fonction de la télomérase sont indiquées. La structure tridimensionnelle de la région RT (doigts-paume-pouce) est identifiée par comparaison avec celle des domaines RT de la sous-unité p66 de la RT de HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus Type I). La taille de la protéine est indiquée. Les dimensions ne sont pas à l'échelle. Voir le texte pour une description plus détaillée.

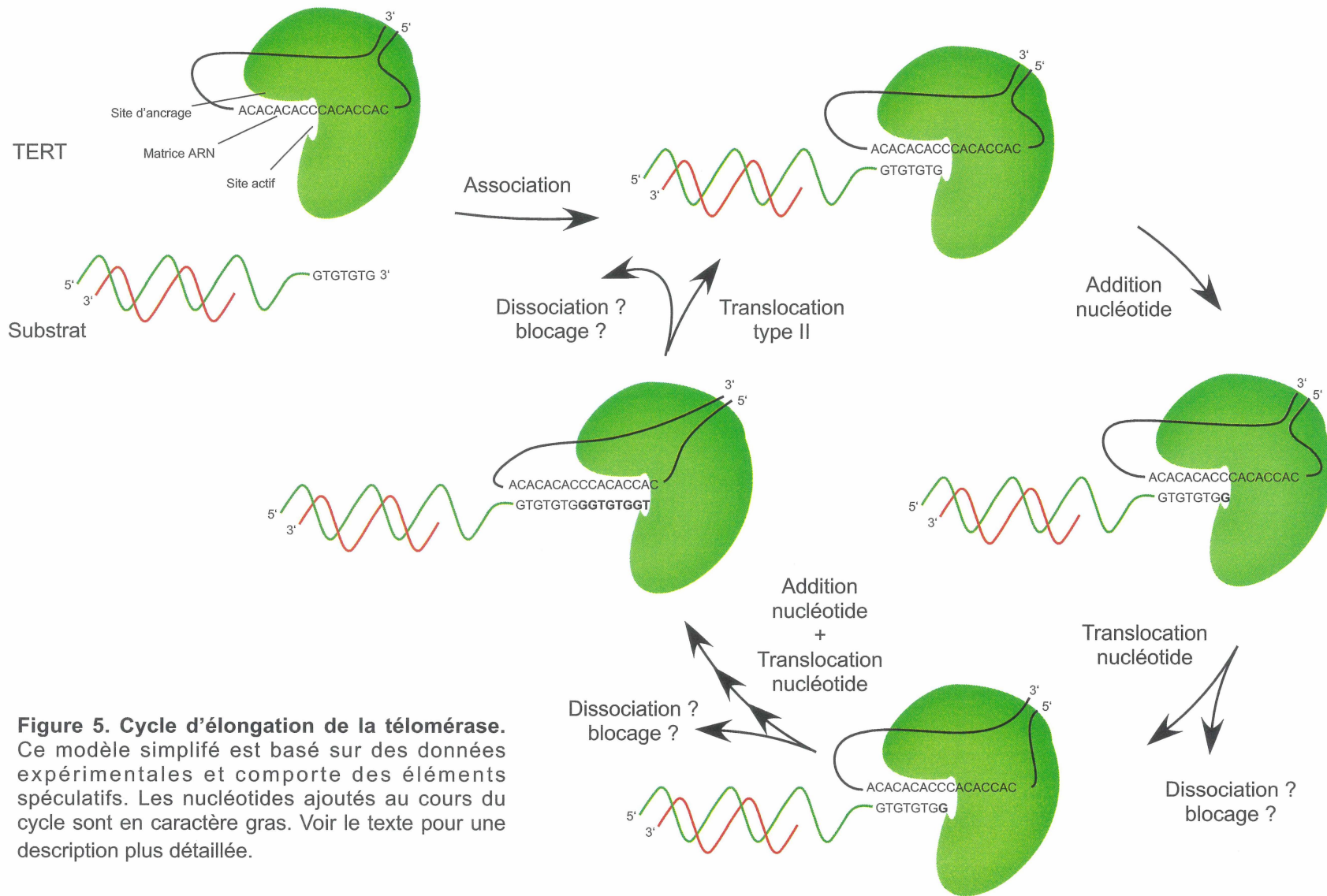


Figure 5. Cycle d'élongation de la télomérase. Ce modèle simplifié est basé sur des données expérimentales et comporte des éléments spéculatifs. Les nucléotides ajoutés au cours du cycle sont en caractère gras. Voir le texte pour une description plus détaillée.

Prescott et Blackburn, 1997a). Dans des conditions réactionnelles identiques, les extraits de *S. castellii* permettent l'ajout de plusieurs répétitions au substrat (Cohn et Blackburn, 1995). La non-dissociation *in-vitro* de la télomérase de *S. cerevisiae* se traduit par un défaut dans la translocation de type II. Il faut cependant noter que certaines conditions réactionnelles permettent de détecter la présence de répétitions supplémentaires (Bosoy et Lue, 2004). En revanche, une série d'observations indique qu'en contexte physiologique, la télomérase de *S. cerevisiae* est essentiellement processive. Les expériences récentes ont montré qu'un télomère initialement court peut devenir très long en l'espace d'un seul cycle cellulaire, suggérant que plusieurs répétitions sont incorporées (Teixeira et al., 2004). De plus, l'analyse de l'évolution de la séquence d'un seul télomère lors des divisions successives d'une cellule a montré que l'irrégularité des répétitions télomériques est liée au fait que la télomérase utilise plusieurs registres pour s'aligner à l'extrémité 3' sur le télomère (Forstemann et al., 2000; Forstemann et Lingner, 2001). Chez *S. cerevisiae* et plusieurs autres organismes, cette flexibilité dans le choix du site de reconnaissance pourrait résulter de l'association de la télomérase à une activité nucléase (Niu et al., 2000; Melek et al., 1996; Collins et Greider, 1993; Oulton et Harrington, 2004).

Les différences de propriétés observées entre les conditions *in-vitro* et le contexte naturel mettent en évidence le fait que la régulation de l'activité télomérase requière des composantes additionnelles et suggèrent que le rallongement des télomères par la télomérase résulte d'un processus qui se déroule en plusieurs étapes étroitement coordonnées et précisément régulées.

Cette régulation qui s'opère aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel implique et est dirigée vers les composantes de la RNP.

Les données recueillies chez les cellules humaines et chez la levure *S. cerevisiae* indiquent que la télomérase pourrait exister sous forme multimérique, fort probablement en dimères (Beattie et al., 2001; Wenz et al., 2001; Arai et al., 2002; Prescott et Blackburn, 1997a). Les modalités de formation des complexes multimériques ne sont pas encore connues, mais la coopération entre deux ou plusieurs télomérases pourrait contribuer à la catalyse ainsi qu'à sa régulation (Kelleher et al., 2002). La composante ARN pourrait participer à cette multimérisation, par interaction ARN-ARN ou TERT-ARN (Tesmer et al., 1999; Moriarty et al., 2002; Ly et al., 2003a; Ly et al., 2003b).

6.2. La composante ARN de la télomérase. Le rôle de l'ARN de la télomérase ne se limite pas à fournir passivement une matrice qui dicte la séquence des répétitions à ajouter aux extrémités télomériques. L'ARN de la télomérase joue un rôle important dans la catalyse (Prescott et Blackburn, 1997b; McEachern et Blackburn, 1995) et constitue un site pour la liaison à une multitude de facteurs composant l'holoenzyme. Cette capacité intrinsèque de l'ARN à recruter des facteurs protéiques est étroitement reliée à sa structure secondaire et tertiaire. La détermination de la structure secondaire de la composante ARN constitue donc une condition nécessaire à la compréhension de la biogénèse et du fonctionnement d'une RNP comme la télomérase.

L'ARN a été la première composante de la télomérase à être clonée, d'abord chez les ciliés (Greider et Blackburn, 1989), puis chez la levure (Singer et

Gottschling, 1994), et chez les mammifères (Blasco et al., 1995; Feng et al., 1995). L'ARN de la télomérase des ciliés est synthétisé par l'ARN polymérase III, comporte une queue poly U, et sa taille varie de 150 à 200 nt (Greider et Blackburn, 1989; Hargrove et al., 1999). Chez les vertébrés, l'ARN de la télomérase est produit par l'ARN polymérase II, générant un transcrit de 300 à 550 nt démunie de capuchon 5'-2,2,7-trimethylguanosine (TMG; Chen et al., 2000; Hinkley et al., 1998; Zaug et al., 1996; Bachand et al., 2001). Chez la levure *S. cerevisiae*, l'ARN de la télomérase est transcrit par l'ARN polymérase II à partir du gène *TLC1*. Lors de sa maturation l'ARN acquiert un capuchon TMG et s'associe aux protéines Sm. Le transcrit qui en résulte contient ~1300 nt et est présent sous deux formes: (1) une forme polyadénylée (poly A⁺) moins abondante, et (2) une forme mature non-polyadénylée (poly A⁻) plus abondante, vraisemblablement dérivée de la forme poly A⁺ (Singer et Gottschling, 1994; Chapon et al., 1997; Seto et al., 1999). Mtr10p, une protéine impliquée dans le transport nucléocytoplasmique d'ARN messagers jouerait un rôle dans l'accumulation de la forme mature (Ferrezuelo et al., 2002).

En absence de données cristallographiques, la stratégie la plus fructueuse pour déterminer la structure secondaire des longs ARNs et établir les liens entre la structure et les fonctions repose sur une interconnexion d'approches variées (Brunel et Romby, 2000). Cependant la comparaison phylogénétique s'avère l'approche autonome la plus puissante pour élucider les structures de plus hautes complexités (James et al., 1989). Ce type d'analyse se fonde sur le paradigme biologique selon lequel des ARNs possédant des fonctions homologues

maintiendront des hélices similaires lors de leur repliement, malgré une variation des nucléotides impliqués dans les appariements secondaires (Westhof et Auffinger, 2000; Figure 6). Ainsi, durant l'analyse d'une hypothétique hélice dans une série d'ARNs homologues, l'apparition d'une mutation ponctuelle sur un brin de l'hélice putative (variation 1) devra être par la suite compensée sur le brin complémentaire (variation 2) afin de maintenir la structure. L'observation de cas de covariation des nucléotides appariés d'une structure homologue à l'autre constitue un indice en faveur du maintien de l'hélice au cours de l'évolution, donc de sa présence. Le succès de l'approche phylogénétique nécessite cependant que deux conditions essentielles soient satisfaites: les séquences homologues doivent (1) être disponibles en nombre suffisant et (2) être séparées par une distance évolutionniste adéquate afin de permettre à la fois la superposition fiable des nucléotides homologues et l'inventaire du maximum de cas de covariation.

En dépit des divergences significatives dans les séquences primaires et les tailles, l'analyse phylogénétique des ARNs de télomérase provenant de 24 espèces de ciliés et de 32 espèces de vertébrés a permis d'établir de façon indépendante une structure secondaire commune au sein de chaque groupe (Figure 7), et révèle des éléments structuraux conservés d'un groupe à l'autre, notamment un domaine pseudonœud crucial pour l'activité enzymatique (ten Dam et al., 1991; Chen et al., 2000; Bachand et al., 2001). Le pseudonœud est une structure tertiaire de l'ARN formée suite à l'appariement des bases d'une région simple brin constituant une boucle avec une région complémentaire non-appariée ailleurs dans la même molécule (Pleij et Bosch, 1989).

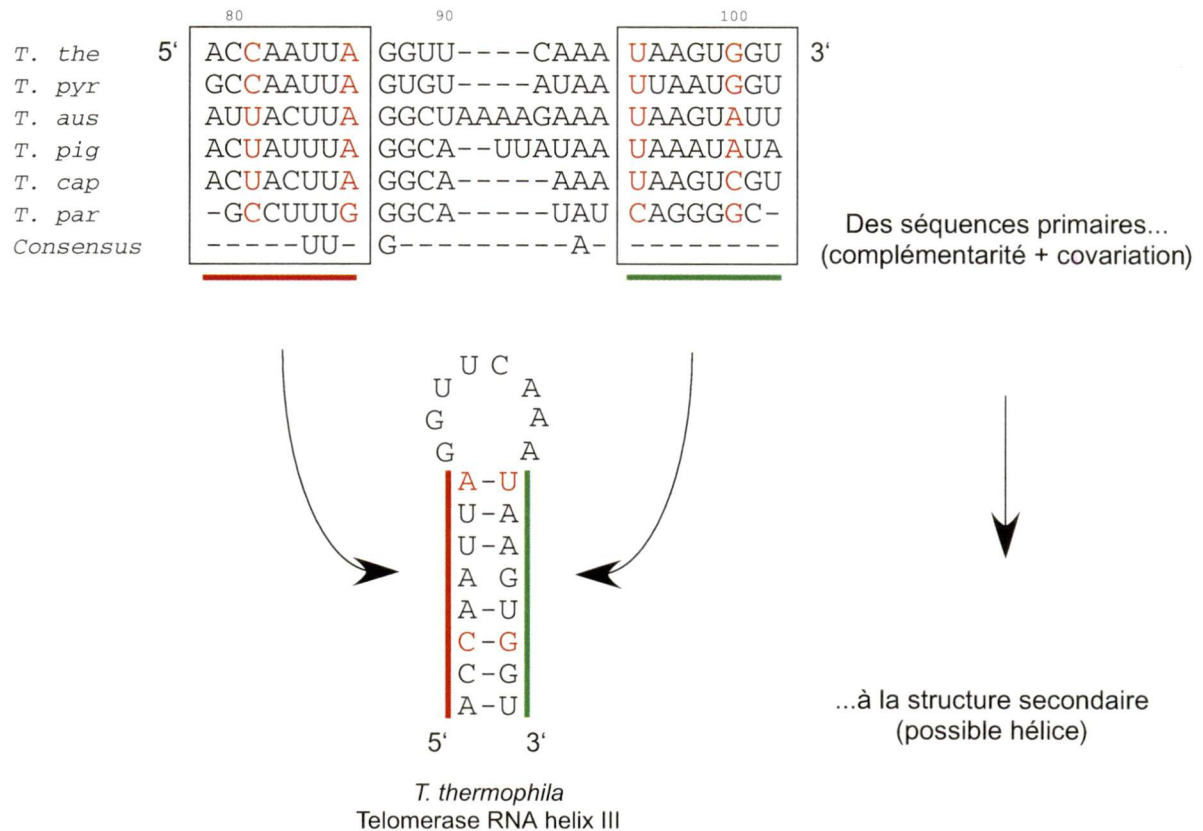


Figure 6. L'analyse phylogénétique comme outil de détermination de la structure secondaire des ARNs. À titre d'exemple, des séquences de l'hélice III de l'ARN de la télomérase provenant de 6 espèces divergentes *Tetrahymena* ont été alignées. Les abréviations sont comme suit: *T. thermophila* (*T. the*), *T. pyriformis* (*T. pyr*), *T. australis* (*T. aus*), *T. pigmentosa* (*T. pyg*), *T. capricornis* (*T. cap*), *T. paravorax* (*T. par*). Dans deux cas de covariation, les nucléotides impliqués sont représentés en rouge. Les tirets (-) indiquent des espaces d'alignement. Alignement tiré de McCormick-Graham, M., et Romerao, D.P., 1995. Voir le texte pour une description plus détaillée.

L'ARN de la télomérase chez les ciliés comporte 4 hélices conservées (Figure 7): l'hélice I est requise pour l'activité enzymatique *in-vitro* (Autexier et Triki, 1999; Autexier et Greider, 1998), alors que l'hélice II moins conservée (absente chez *Tetrahymena paravorax*), joue un rôle important dans la définition de la barrière matricielle et l'association de TERT (McCormick-Graham et Romero, 1995; Licht et Collins, 1999; Lai et al., 2002). Les hélices IIIa et IIIb forment une structure en pseudonoeud cruciale pour l'assemblage de la RNP *in-vivo* (Gilley et Blackburn, 1999), mais non-essentielle pour l'activité *in-vitro* (Autexier et Greider, 1998; Licht et Collins, 1999). La partie distale de la tige boucle de l'hélice IV est importante pour la processivité de la télomérase et l'interaction avec TERT (Sperger et Cech, 2001; Mason et al., 2003; Lai et al., 2003).

Chez les vertébrés, l'ARN de la télomérase comporte 7 domaines remarquablement conservés (CR: Conserved Region 1 à 7; Figure 7): le domaine pseudonoeud (CR2-CR3) est essentiel pour l'activité télomérase *in-vitro* en dépit du fait qu'il soit superflu pour l'association de TERT (Autexier et al., 1996; Bachand et al., 2001; Martin-Rivera et Blasco, 2001). Les domaines CR4 et CR5 contiennent un site de haute affinité pour TERT, site impliqué dans l'activité catalytique (Tesmer et al., 1999; Chen et al., 2002; Mitchell et Collins, 2000; Bachand et al., 2001; Dragon et al., 2000). La boîte H/ACA (CR6/CR8) en interaction avec les protéines associées aux snoRNA telles que la dyskerine et GAR1, ainsi que le domaine CR7 participent à la stabilité, la maturation et la localisation de hTR (Dragon et al., 2000; Mitchell et al., 1999a; Chen et al., 2000; Lukowiak et al., 2001).

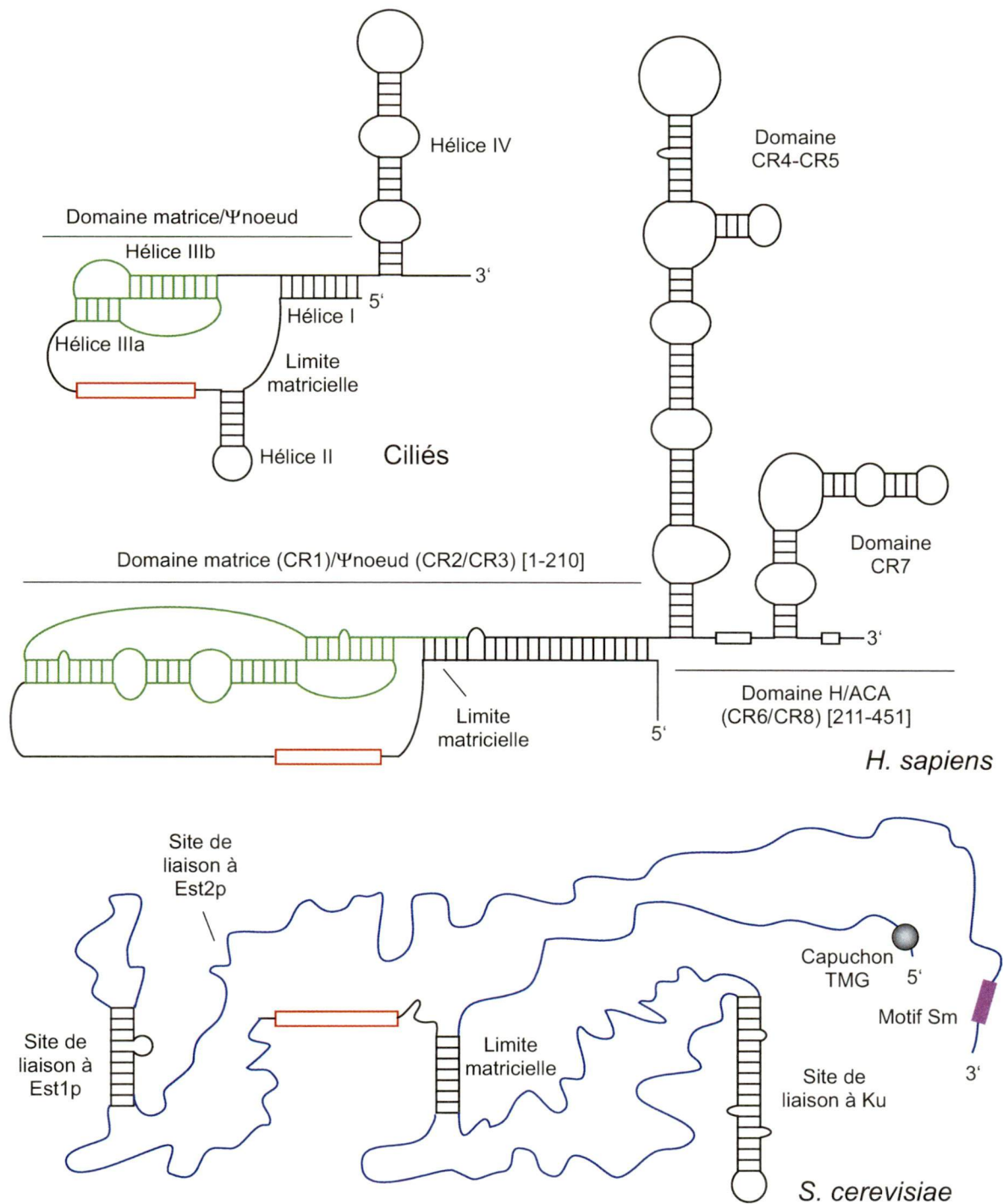


Figure 7. Organisation structurale et fonctionnelle de l'ARN de télomérase. La structure secondaire de l'ARN de la télomérase des ciliés et de l'humain, de même que les éléments caractérisés chez la levure *S.cerevisiae* sont représentés. La matrice est indiquée par un rectangle rouge. La région verte met en évidence le pseudonoeud. La ligne bleue correspond aux régions dont la structure n'est pas connue. Voir le texte pour une description plus détaillée.

La structure secondaire prédite par l'analyse phylogénétique est généralement consistante avec les résultats d'analyses par sondes biochimiques (Zaug et Cech, 1995; Antal et al., 2002; Leeper et al., 2003).

Au contraire des ciliés et des vertébrés, l'ARN de la télomérase chez la levure, appelé TLC1 chez *S. cerevisiae* et TER1 chez *Kluyveromyces lactis* (Singer et Gottschling, 1994; McEachern et Blackburn, 1995), n'a pas de structure secondaire établie à ce jour. Le faible bassin de séquences disponibles (1 espèce de *Saccharomyces* et 6 espèces de *Kluyveromyces*), la rapide divergence de ces séquences, ainsi que leur taille relativement importante (1300 nt) n'ont pas permis l'utilisation de l'approche phylogénétique. En revanche, des travaux précédents essentiellement basés sur l'insertion de mutations ponctuelles et la délétion de segments d'ARN ont contribué à caractériser localement quelques éléments fonctionnels au sein de TLC1 et TER1 (Figure 7). TLC1 contient une séquence de 17 bases (3'-ACACACACCCACACCAC-5'), comportant la matrice de 7 bases (soulignée) qui détermine la séquence des répétitions ajoutées aux télomères. L'insertion de mutations ponctuelles créant un site de restriction *HaeIII* dans la matrice se traduit par l'apparition de ce site au sein des télomères, confirmant le rôle de cette portion de l'ARN (Singer et Gottschling, 1994). La matrice de TER1 comprend 25 bases (3'-AAACUAGUCCAUAACACCACAUGCCUAAACU-5'; McEachern et Blackburn, 1995). Le clonage et le séquençage de quatre homologues supplémentaires de *TER1* chez les membres de l'espèce *Kluyveromyces* a permis d'utiliser l'analyse phylogénétique et de mettre en évidence, en 5' de la matrice, une courte hélice servant de limite matricielle (Tzfati

et al., 2000). En absence de séquences homologues, l'utilisation d'algorithmes de prédiction de structures secondaires basés sur la minimisation de l'énergie s'est révélée fructueuse pour retrouver la limite matricielle de l'ARN de la télomérase chez *S. cerevisiae* (Seto et al., 2003). L'accroissement récent du bassin d'homologues de *TER1* à six a permis d'utiliser l'approche phylogénétique pour identifier deux régions fortement conservées et formant une structure en pseudonoeud, essentielle à l'activité télomérase (Tzfati et al., 2003). Chez *S. cerevisiae*, des travaux antérieurs indiquent qu'une portion centrale de TLC1 est capable de s'associer à TERT (Est2p; Livengood et al., 2002), mais à ce jour aucune structure en pseudonoeud n'y a été trouvée. L'hétérodimère Yku70/Yku80, impliqué à la fois dans l'architecture des télomères (voir section 3.1) et dans la réparation des DSBs par NHEJ (voir section 4), peut également interagir avec la télomérase via un site de liaison en tige-boucle de TLC1 (Peterson et al., 2001; Stellwagen et al., 2003). La portée fonctionnelle de l'association entre Yku et TLC1 n'a pas encore été élucidée, mais elle pourrait contribuer au recrutement ou au positionnement de la télomérase aux télomères (voir section 6.3.2). Est1p est une sous-unité de la télomérase essentielle au rallongement des télomères chez *S. cerevisiae* (voir section 6.3.2). Des homologues de *EST1* ont été retrouvés chez les cellules humaines (Snow et al., 2003; Reichenbach et al., 2003) et la levure à fission (Beernink et al., 2003) grâce à une approche bioinformatique, suggérant des fonctions conservées au cours de l'évolution. Chez *S. cerevisiae*, Est1p s'associe à un segment de TLC1 proche du site de liaison de Est2p (Livengood et al., 2002). L'analyse comparative de séquences de *TLC1* avec des homologues de

TER1 a révélé que le site de liaison de Est1p adopte un repliement en tige-boucle interne dont l'intégrité est cruciale à la fonction des télomères (Seto et al., 2002). Près de l'extrémité 3' de TLC1 et de TER1 se trouve un site consensus essentiel pour l'association des protéines Sm (5'-AAUUUUUGG-3'; Seto et al., 1999; Tzfati et al., 2003). Les snRNPs (small nuclear Ribonucleoproteins) du spliceosome forment différentes particules constituées d'un snRNA (small nuclear RNA: U1, U2, U4/U6 et U5), de protéines spécifiques et de 7 protéines Sm (B/B', D1, D2, D3, E, F et G) communes (synthèse: Kaufer et Potashkin, 2000; Will et Luhrmann, 2001). L'assemblage des protéines Sm au snARN est une étape importante pour la biogénèse de la snRNP, notamment pour sa stabilité, l'hyperméthylation du capuchon 5' (de m7G à 2,2,7-triméthylguanosine), le transport au noyau et le recrutement de certaines protéines (Plessel et al., 1994). La présence au sein de l'ARN d'un motif hautement conservé parmi les eucaryotes (consensus = 5'-PuAU₃₋₄NUGPu-3') constitue un des déterminants nécessaires à l'assemblage du noyau Sm d'ARN. Cette séquence est généralement flanquée de structures en tige-boucle (Branlant et al., 1982; Liautard et al., 1982). Chez *S. cerevisiae*, des analyses mutationnelles effectuées *in-vivo* et *in-vitro* ont montré l'importance des nucléotides au sein du consensus Sm pour la reconnaissance et l'association des protéines Sm (Jones et Guthrie, 1990; Jarmolowski et Mattaj, 1993; Raker et al., 1999; Urlaub et al., 2001). Par la présence du site Sm, TLC1 et TER1 s'apparentent aux snRNPs, ce qui suggère des voies de biogénèse communes chez les levures. En revanche, ces voies de biogénèse divergent

fondamentalement de celle des mammifères dont l'ARN comporte plutôt un domaine H/ACA à l'extrémité 3'.

Malgré la mise en évidence de ces éléments structuraux chez la levure, l'information relative à la structure d'ensemble de l'ARN de la télomérase demeure fragmentaire. Chez *S. cerevisiae* par exemple, les données structurales couvrent moins de 10% de la taille de TLC1. Cette méconnaissance des interactions secondaires de l'ARN de la télomérase chez la levure entrave la compréhension des mécanismes impliqués dans la biogenèse et la fonction de la RNP.

6.3. Mécanismes de régulation et de coordination de l'homéostasie de l'élongation des télomères

6.3.1. Contrôle de l'accessibilité du brin G-riche par la conformation du télosome. Lors de la progression du cycle cellulaire, l'accès à l'ADN télomérique doit être facilité pour certains facteurs et réprimé pour d'autres, afin de ne pas nuire à l'intégrité du chromosome. Ainsi, durant la phase S, le télosome doit être restructuré de façon à ce que l'ADN télomérique accède aux facteurs de réplication tout en se distinguant des DSBs (voir section 5). Le fait que le passage de la fourche de réplication aux télomères ne déclenche pas les mécanismes de réponse aux dommages suggère que l'ADN télomérique demeure protégé durant la phase S. Les mécanismes à la base de la régulation de l'accessibilité des télomères ne sont pas entièrement connus, mais les systèmes intrinsèques de détection de la longueur des télomères semblent jouer un rôle déterminant.

Chez *S. cerevisiae*, le principal effecteur de la transition ouvert/fermé du télosome est la protéine Rap1p et ses facteurs associés, les protéines Rif et Sir

(voir section 3.1). Le complexe formé par Rap1p fonctionne comme un senseur de la taille des télomères en « comptant » le nombre de répétitions et réprime la capacité d'extension de la télomérase au-delà d'une certaine longueur (Hardy et al., 1992; Wotton et Shore, 1997). Ce modèle de régulation de l'élongation centré sur Rap1p est basé sur des expériences où des versions de Rap1p modifiées de façon à cibler le domaine de liaison à l'ADN sur un seul télomère. L'analyse de la taille de ce télomère montre un raccourcissement proportionnel au nombre de molécules recrutées (Marcand et al., 1997; Ray et Runge, 1999). De plus, lorsqu'un télomère initialement court est rallongé par la télomérase, la cinétique de rallongement diminue à mesure que le télomère atteint sa longueur d'équilibre (Marcand et al., 1999). Cette observation suggère que l'action de la télomérase est graduellement inhibée *en cis* par le continuum de conformations adoptées par le télosome. Les modalités de cette régulation sont mal comprises, mais le recrutement des protéines Rif1p et Rif2p par Rap1p semble déterminant puisque leur absence se traduit par l'augmentation de la longueur médiane des télomères comparativement aux souches de type sauvage (Hardy et al., 1992; Wotton et Shore, 1997). Des données récentes montrent que le remodelage de la chromatine induit par les protéines Rif contribue à réduire la probabilité des événements d'extension des télomères au cours d'un cycle cellulaire. Cette situation se manifeste par un télosome moins favorable à l'élongation (Smith et al., 2003; Teixeira et al., 2004). Ces données suggèrent un modèle selon lequel l'état structural du télosome chez la levure constitue *per se* un mécanisme de régulation de l'homéostasie de la longueur des télomères. Le télosome serait assez

dynamique pour alterner entre une configuration « ouverte » extensible et une configuration « fermée » peu favorable à l'élongation. Le télosome dans sa forme fermée empêche la réplication des télomères qui raccourcissent progressivement, ce qui réduit le nombre de protéines associées aux séquences télomériques et entraîne l'ouverture graduelle du télosome. L'accessibilité restaurée favorise à nouveau l'action de la télomérase et de la machinerie conventionnelle. Le rallongement des télomères s'accompagne de la ré-association progressive des protéines télomériques, induisant à nouveau la transition vers la forme fermée restrictive. Ce processus stochastique et imprécis permet néanmoins de stabiliser les télomères dans des limites inférieures et supérieures adéquates (Figure 8).

Chez l'humain, des mécanismes de régulation similaires au système de comptage décrit chez la levure ont été proposés et reposeraient sur les complexes formés autour de TRF1 et TRF2 (voir section 3.1). L'observation directe de cellules vivantes a récemment montré que ces complexes s'associent et se désolidarisent continuellement de leur site télomérique (Mattern et al., 2004), ce qui supporte le caractère dynamique du T-loop/D-loop (voir section 3.1; Figure 3).

6.3.2. Coordination de la synthèse des brins G-riche et C-riche. La nécessité d'une extension G-riche pour la réplication de l'ADN télomérique en phase S a été postulée (Wellinger et al., 1993b; McElligott et Wellinger, 1997) bien avant que des travaux ne révèlent que la télomérase utilise non pas un ADN double brin, mais plutôt une extension simple brin comme substrat (Lingner et Cech, 1996). Au cours de la réplication conventionnelle, l'extrémité franche créée suite à la synthèse du brin avancé doit être transformée en une extension simple

brin G-riche par résection du brin C-riche (Wellinger et al., 1996; Diede et Gottschling, 2001). Les activités enzymatiques contribuant à la formation de cette extension n'ont pas encore été identifiées (Larrivée et al., 2004).

Bien que la présence d'extensions G-riche aux deux extrémités des chromosomes demeure généralement acceptée, des études récentes réalisées chez la levure *S. cerevisiae* montrent que la télomérase ne rallonge pas toutes les extrémités chromosomiques au cours d'un seul cycle de division (Forstemann et al., 2000; McEachern et al., 2002). Ces données suggèrent que la réplication conventionnelle des brins avancé et retardé génère respectivement une extrémité franche (ou avec un G-riche très court) et une extrémité avec une longue extension G-riche. À cause de cette asymétrie, un seul des deux télomères d'un chromosome constituerait un substrat pour la télomérase. Cette notion d'asymétrie semble également s'appliquer aux cellules humaines puisque la dysfonction des télomères causée par l'expression d'une forme dominant-négatif de TRF2 peut, en phase S, conduire à la fusion préférentielle des extrémités du brin avancé de deux chromatides par NHEJ (Bailey et al., 2001; Bailey et al., 2004b).

Chez *S. cerevisiae*, les longues extensions simple brin qui apparaissent en fin de phase S constituent un site de très haute affinité pour une ou plusieurs molécules de Cdc13p (Wellinger et al., 1993a; Wellinger et al., 1993b; Lin et Zakian, 1996; Nugent et al., 1996; Virta-Pearlman et al., 1996; Hughes et al., 2000b). Les multiples fonctions télomériques de Cdc13p contribuent à la protection du chromosome. Chez le mutant *cdc13-2* (Lingner et al., 1997a; Nugent et al., 1996) les télomères raccourcissent progressivement, bien que les essais *in-vitro*

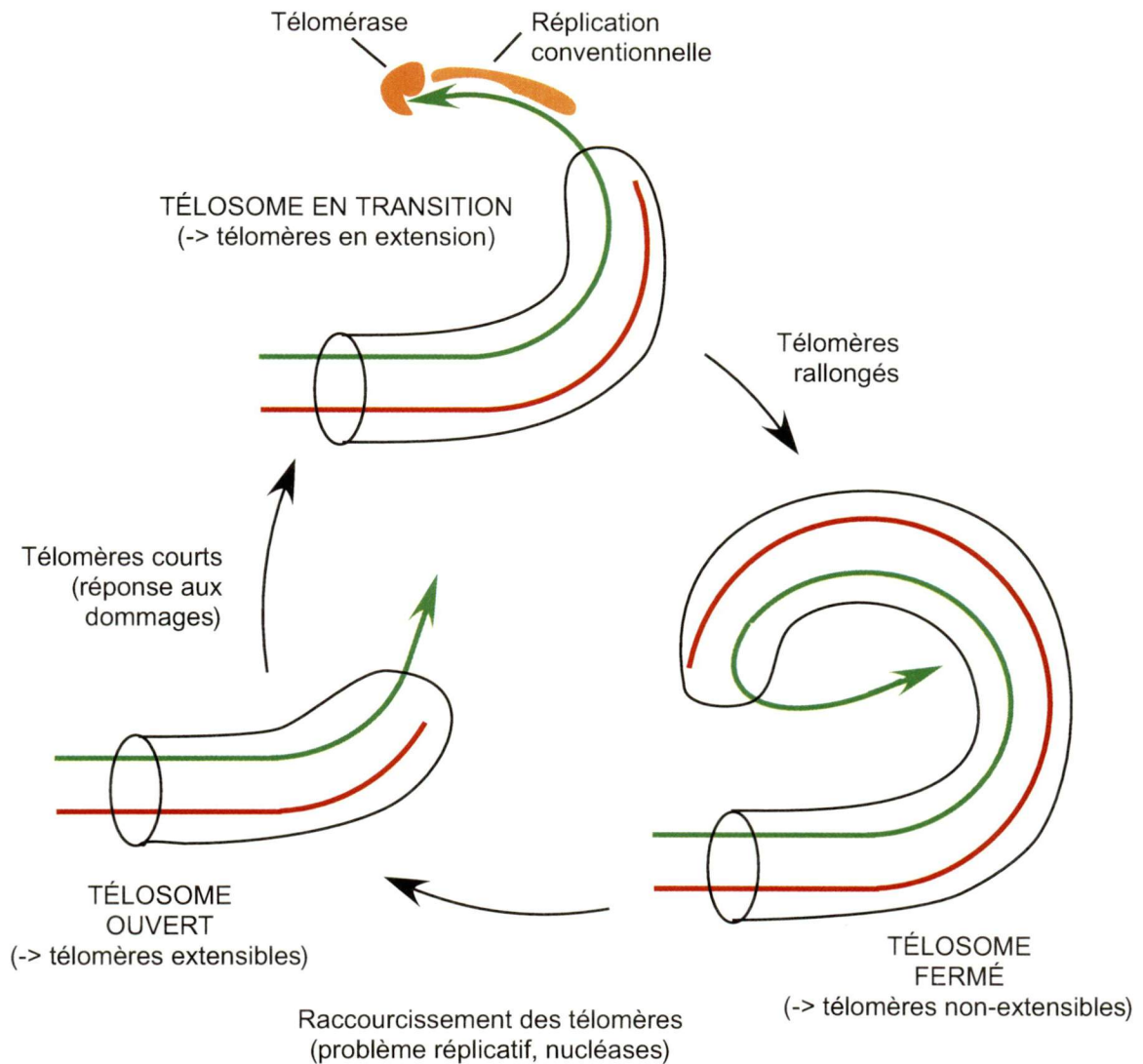


Figure 8. Changements conformationnels du télosome. Le problème réplcatif terminal combiné à l'action d'éventuelles nucléases entraîne le raccourcissement des télomères. Les télomères étant à nouveau accessibles, le brin G-riche (vert) est rallongé par la télomérase. La réplcation du brin C-riche (rouge) est effectuée par la machinerie conventionnelle. Les variations de la longueur du télomère se produisent à l'intérieur de limites bien contrôlées et se traduisent par la transition entre divers états du télosome. Adapté de Blackburn, E.H., 2001. Voir le texte pour une description plus détaillée.

permettent de détecter une activité télomérase, indiquant que Cdc13p contribue également à la réplication des télomères. Une série de données génétiques ont révélé que Cdc13p interagit directement avec Est1p, une composante de la télomérase associée à l'ARN, et que le défaut télomérique associé à la mutation *cdc13-2* résulterait de la perte cette interaction. Ces données ont permis de proposer un modèle de recrutement selon lequel Cdc13p intervient dans la réplication des télomères en permettant à la télomérase d'accéder au télomère par l'intermédiaire de Est1p (Evans et Lundblad, 1999; Pennock et al., 2001; Qi et Zakian, 2000; Evans et Lundblad, 2002). Cependant, des données additionnelles reposant sur des essais de chIP indiquent que les modalités du recrutement de la télomérase sont plus complexes. Est2p est associée aux télomères durant la majeure partie du cycle cellulaire indépendamment de la présence de Cdc13p (Taggart et al., 2002; Smith et al., 2003), même en G1 et tôt en phase S, lorsque la télomérase est inactive (Marcand et al., 2000). Par contre, Est1p s'associe aux télomères seulement en fin de phase S, un moment correspondant à la fois à son pic d'expression et à l'activité de la télomérase (Taggart et al., 2002). Ces données ont permis de proposer un modèle alternatif selon lequel l'action de la télomérase en fin de phase S résulte de la collaboration fonctionnelle entre Est1p et Cdc13p. Cdc13p serait un régulateur positif de l'élongation par la télomérase en repositionnant la télomérase sur l'extrémité G-riche alors que Est1p est un activateur de Est2p (Taggart et al., 2002). Dans ce modèle, le complexe Yku70/Yku80 pourrait faciliter le repositionnement de la télomérase grâce à sa capacité à s'associer aussi bien aux télomères qu'à TLC1 (Peterson et al., 2001;

Grandin et al., 2000). Ce rôle de régulateur positif de Yku est renforcé par des expériences montrant que la présence de ce complexe est nécessaire pour obtenir les télomères rallongés de certaines allèles *cdc13* et aussi par le fait que l'expression d'une protéine de fusion Cdc13p-Yku70 entraîne un rallongement des télomères (Grandin et al., 2000). RPA (Replication Protein A) est un complexe protéique participant à une variété de processus chromosomiques comme la réplication, la recombinaison, la réparation et le maintien des télomères (Smith et al., 2000). Des travaux récents de Géli et ses collaborateurs suggèrent que le rôle de RPA aux télomères consisterait à faciliter l'accès de EST1p, régulant ainsi l'action de la télomérase (Schramke et al., 2004).

Plusieurs études récentes suggèrent que le maintien adéquat de l'homéostasie de la longueur des télomères nécessite la coordination entre la synthèse du brin G-riche et celle du brin C-riche. Chez la levure *S. cerevisiae*, la présence du brin G-riche nécessite le passage de la fourche de réplication à travers les télomères (Dionne et Wellinger, 1998), suggérant que la formation des longues extensions simple brin, l'élongation des télomères et le recrutement de la machinerie de réplication conventionnelle sont des processus concomitants. De plus, certaines allèles thermosensibles de la pol α ont, à température semi-restrictive, des télomères et le brin G-riche rallongés (Adams Martin et al., 2000), indiquant que l'abolition de la synthèse du brin C-riche, normalement coordonnée avec l'élongation du brin G-riche, permet à la télomérase d'allonger le brin G-riche au-delà de sa longueur normale. Des phénotypes similaires ont été observés dans des souches de levure arborant certaines allèles thermosensibles de *CDC13* et de

STN1 (Grandin et al., 1997 Qi et Zakian, 2000; Chandra et al., 2001), suggérant que les produits de ces deux gènes puissent participer à la coordination de la synthèse des deux brins. Cette possibilité a été renforcée par le fait que Cdc13p s'associe avec la sous-unité catalytique de la pol α et que la surproduction de Stn1p élimine le phénotype de télomères allongés observés dans les mutants *CDC13* et de la pol α (Chandra et al., 2001). Cdc13p s'associe à Stn1p et à Ten1p (Grandin et al., 1997; Grandin et al., 2001a) et cette association est abolie chez certains mutants Cdc13p (Chandra et al., 2001). Ces observations ont permis de proposer que Cdc13p, de concert avec Stn1p/Ten1p intervient pour limiter l'élongation des télomères (Pennock et al., 2001). Cdc13p se présente donc à la fois comme un régulateur positif et négatif de l'activité de la télomérase. Ces fonctions antagonistes de Cdc13p résultent vraisemblablement de sa capacité à former des complexes distincts aux télomères en vue de coordonner la synthèse des brins télomériques avancé et retardé. Cette possibilité est soutenue par des données montrant que Stn1p et Est1p sont en compétition pour le même site d'association à Cdc13p (Pennock et al., 2001). Ces données s'intègrent dans un modèle où suite à la synthèse du brin G-riche, Stn1p/Ten1p libère Est1p de son association avec Cdc13p, ce qui permet l'accès au complexe pol α /primase (Synthèse Lustig, 2001). Le rôle spécifique de Est3p au sein de ce processus d'activation de la télomérase n'a pas encore été déterminé (Hughes et al., 2000a; Friedman et al., 2003).

Les modalités de recrutement et d'activation de la télomérase chez l'humain sont mal comprises. Les protéines hnRNPC1/C2 et A1/UP1 associées à hTR

pourraient jouer un rôle dans le recrutement de la télomérase (Ford et al., 2000; Fiset et Chabot, 2001). De plus, la présence simultanée de hnRNPA1 et UP1 aux télomères et au sein de la télomérase (Fiset et Chabot, 2001) renforce la possibilité que ces facteurs participent au recrutement de la télomérase aux télomères (voir section 6.3.2). Récemment, trois orthologues de *EST1*, dont deux (*EST1A* et *EST1B*) encodent des protéines associées à la télomérase, ont été identifiés dans le génome humain, suggérant une conservation de fonctions avec Est1p (Reichenbach et al., 2003; Snow et al., 2003).

7. Les autres solutions au problème réplcatif terminal

Bien que la télomérase soit la solution la plus répandue pour contrebalancer la perte des répétitions télomériques, les systèmes biologiques ont développé d'autres mécanismes dédiés, et fonctionnellement équivalents. De plus, dans certaines situations où la voie principale est abolie, les cellules peuvent utiliser des mécanismes de secours.

Bien que la plupart des insectes possèdent les répétitions télomériques typiques, les diptères et plusieurs insectes apparentés semblent avoir perdu l'usage de la télomérase au cours de l'évolution au profit de voies de secours préexistantes (Frydrychova et Marec, 2002). La rétrotransposition est utilisée par les diptères supérieurs, en l'occurrence la mouche à fruit *D. melanogaster*, pour garder leurs extrémités chromosomiques intactes. Chez *D. melanogaster*, les extrémités des chromosomes sont des composites de deux éléments transposables appelés HeT-A et TART. Occasionnellement, HeT-A et TART sont

insérés au bout du chromosome en utilisant l'extrémité 3' comme amorce pour effectuer la transcription inverse de son génome d'ARN (Biessmann et al., 1997; synthèse dans Pardue et DeBaryshe, 2003). Chez les diptères inférieurs comme *Anopheles gambiae* et ceux du genre *Chironomous* (Nielsen et Edstrom, 1993; Roth et al., 1997) de même que chez certaines plantes (Pich et al., 1996; Adams et al., 2001), c'est par recombinaison que les extrémités des chromosomes sont maintenues. Ce mode de maintien des chromosomes est basé sur l'amplification ou le réarrangement de séquences déjà présentes.

Chez la plupart des cellules somatiques humaines normales, l'activité de la télomérase est faible ou indétectable et, par voie de conséquence, ces cellules ont une capacité répllicative limitée. *A contrario*, la vaste majorité des cellules tumorales humaines (90 à 95%) et des cellules en culture immortalisées *in-vitro* (70%) maintiennent leurs télomères par la télomérase (Kim et al., 1994; Shay et Bacchetti, 1997). La proposition selon laquelle la réactivation de la télomérase constitue une étape cruciale vers la tumorigénèse est soutenue par des expériences montrant que l'expression de l'enzyme dans les fibroblastes primaires suffit à les immortaliser alors que la répression de la télomérase inhibe la croissance des cellules tumorales (Vaziri et Benchimol, 1998; Bodnar et al., 1998; Hahn et al., 1999; Zhang et al., 1999). La télomérase apparaît donc comme une cible privilégiée pour les thérapies anti-cancer (Guiducci et al., 2001; Kim et al., 2001; Marusic et al., 1997; Li et al., 2004; synthèse dans Reddel, 2003). Cependant, le maintien des télomères dans les cellules immortalisées ne dépend pas exclusivement de la télomérase puisqu'une sous-population (5 à 10%) des

cellules cancéreuses humaines n'ont pas d'activité télomérase détectable, et maintiennent leurs télomères en utilisant une voie supplétive appelée ALT (Alternative Lengthening of Telomeres; Shay et Bacchetti, 1997; Dunham et al., 2000; pour synthèse voir Reddel, 2003). Les cellules ALT se caractérisent par des TRFs (Terminal Restriction Fragments) de longueur hétérogène et par la présence d'APBs (ALT-Associated Promyelocytic leukemia Body). Ces complexes intracellulaires contiennent de l'ADN télomérique, des protéines associées aux télomères et des protéines impliquées dans la recombinaison (Yeager et al., 1999; Henson et al., 2002; Tarsounas et al., 2004). Des expériences montrant qu'un marqueur initialement présent sur un télomère d'une lignée cellulaire ALT se propage à d'autres télomères renforce la possibilité que les cellules ALT utilisent un mécanisme basé sur la recombinaison (Dunham et al., 2000; Bailey et al., 2004a).

En fait, les premières données associant la voie de recombinaison au maintien des télomères proviennent d'études réalisées chez des levures, particulièrement de *S. cerevisiae* (Shampay et al., 1984; Walmsley et Petes, 1985). Cependant, c'est seulement suite à la découverte de la télomérase et à l'étude de souches dépourvues d'activité télomérase que l'implication de la recombinaison dans le maintien des télomères sera confirmée. Chez *S. cerevisiae*, l'absence de télomérase entraîne un raccourcissement progressif des télomères et une sénescence concomitante après 60 à 70 générations (voir section 6.). Bien que la majorité des cellules meurent, une faible population arrive à surmonter les incidences létales de la sénescence. Ces survivants rallongent leurs télomères par

la voie de recombinaison homologue contrôlée par *RAD52* (Lundblad et Blackburn, 1993; Le et al., 1999; Teng et Zakian, 1999). L'extension d'un télomère par recombinaison homologue est effectuée par des polymérases conventionnelles et utilise l'ADN d'un second télomère comme matrice. L'analyse des fragments terminaux de restriction chez les survivants révèle que les séquences télomériques et sous-télomériques ont subi des réarrangements dont les profils correspondent à différents modes de recombinaison. L'utilisation préférentielle de l'un ou l'autre de ces modes de recombinaison dépend de la nature des structures en présence et permet de classer les survivants en deux groupes (Figure 9): (1) les survivants de type I amplifient massivement les éléments sous-télomériques Y', maintiennent leurs télomères relativement courts et utilisent la branche de la recombinaison homologue dépendant de *RAD52*, *RAD51*, *RAD54*, *RAD55* et *RAD57*; (2) les survivants du type II amplifient les répétitions télomériques pour rallonger leurs télomères et passent par la voie de la recombinaison dépendant de *RAD52*, *RAD59*, *SRS2*, *SGS1*, *TID1* et du complexe *RAD50/XRS2/MRE11*. Il faut cependant noter que les deux branches de recombinaison dépendant de *RAD52* ne sont pas cloisonnées de façon absolue puisque des survivants de type II peuvent se former en absence de Rad50p, bien qu'à très faible fréquence (Lundblad et Blackburn, 1993; Le et al., 1999; Teng et Zakian, 1999; Chen et al., 2001; Signon et al., 2001). Récemment, des études indépendantes ont montré que l'exonucléase 5' à 3' encodée par le gène *EXO1* joue un rôle d'initiateur dans la génération des survivants de type I et II (Maringele et Lydall, 2004; Bertuch et Lundblad, 2004).

8. États pathologiques associés à la dysfonction du maintien des télomères

Tout comme les cellules primaires, les cellules tumorales ont besoin de maintenir leurs télomères pour assurer leur prolifération à long terme. Dans la majorité des cas, ce maintien se fait grâce à la réactivation de hTERT (synthèse dans Cong et al., 2002). En tant que tel, l'activité télomérase n'induit pas la transformation (Morales et al., 1999) et, bien que la télomérase soit nécessaire à l'immortalisation, hTERT n'est pas un oncogène (Hahn et al., 1999; Hahn et al., 2002). À l'inverse, le déclenchement de la transformation ne requiert pas l'activité télomérase et les cellules ayant de très longs télomères peuvent avoir un phénotype cancéreux *in-vitro* sans pour autant avoir un mécanisme de maintien des télomères. L'importance clinique de la télomérase va cependant au-delà de son rôle dans la carcinogénèse puisque plusieurs maladies génétiques sont directement associées à une dysfonction de l'enzyme. Ainsi, la forme autosomale dominante de la dyskératose congénitale est provoquée par des mutations dans le gène encodant l'ARN de la télomérase humaine (Vulliamy et al., 2001). Par contre la forme sexuelle de la dyskératose congénitale résulte de mutations dans le gène DCK1 encodant la dyskérine, une protéine associée à l'ARN de la télomérase et impliquée dans son accumulation. Ces mutations se traduisent par l'incapacité de la dyskérine à s'associer convenablement à la télomérase (Mitchell et al., 1999b). De plus, certains patients atteints d'anémie aplasique, une maladie caractérisée par la dysfonction de la moelle osseuse, ont également des mutations dans l'ARN de la télomérase (Vulliamy et al., 2002).

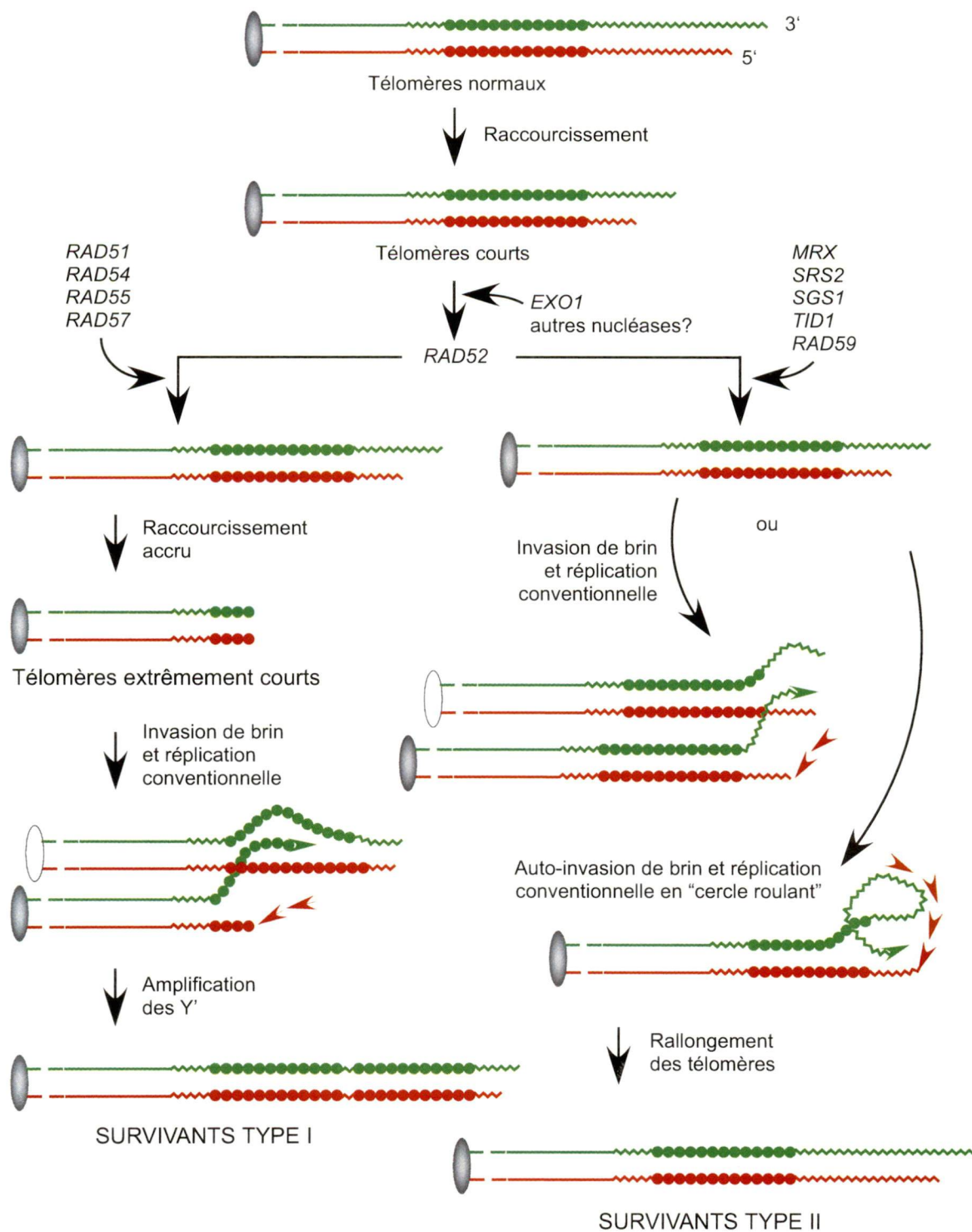


Figure 9. Modes de génération des survivants en absence de télomérase chez *S. cerevisiae*.

En absence de télomérase, les télomères sont maintenus grâce à la recombinaison homologue médiée par les polymérases conventionnelles. Le brin invasif (pointes vertes) est rallongé par la réplication semi-conservative. Le brin néo-formé sert ensuite de matrice à la synthèse du brin complémentaire par élongation des amorces (pointes rouges). Le gène *RAD52* contrôle deux voies de recombinaison impliquant les séquences télomériques (zig-zag) ainsi que les séquences Y' (cercles pleins). Ces voies distinctes permettent d'assurer la survie des cellules. Voir le texte pour une description plus détaillée.

CHAPITRE I

Détermination du rôle de *CDC13* dans la formation d'un profil de réplication aberrant aux télomères d'un chromosome artificiel

Préambule

Afin de vérifier l'éventuelle implication de la protéine Cdc13p dans l'initiation de la réplication aux télomères, nous avons utilisé une souche dans laquelle le gène normal *CDC13* a été remplacé par le mutant *cdc13-2* au locus génomique. Bien que Cdc13p ait conservé sa capacité à s'associer à l'extension simple brin, la protéine mutante est incapable de recruter la télomérase, ce qui provoque une perte progressive des séquences télomériques. Dans la souche de départ, les télomères sont maintenus grâce à un plasmide contenant le gène normal *CDC13*. Le retrait subséquent de ce plasmide confère alors à la souche le phénotype mutant *cdc13-2*. Un chromosome artificiel comportant une origine de réplication (ARSH4) interne en position excentrée a été introduit dans la souche et récupéré après quelques rondes de réplication. L'analyse comparative des profils de réplication de ce chromosome artificiel en gel 2D dans la souche mutante et dans la souche normale montre sans ambiguïté que le défaut associé à la mutation *cdc13-2* n'affecte en rien la réplication aux télomères.

Objectif du projet

Notre laboratoire a suggéré qu'à la fin de la phase S les télomères subissent un traitement par lequel ils acquièrent de longues extensions simple brin, substrat de la télomérase pour l'allongement des télomères, et qui pourraient être générées par une des protéines associées à l'enzyme (voir section 6.3.2). Chez *S. cerevisiae*, la présence de ces extensions aux deux extrémités d'un chromosome artificiel favorise la formation d'interactions télomère-télomère intrachromosomiques appelées CFP (Circular Form of the Plasmid), visibles par gel d'électrophorèse à deux dimensions (gel 2D). Dans une souche de levure, la réduction ou la disparition des CFP à cause d'un gène défectueux indique que le produit de ce gène contribue à la génération des extensions G-riche. Julie Parenteau a introduit ce chromosome artificiel dans des souches dépourvues de plusieurs gènes de la voie de la télomérase et établi son profil de réplication par gel 2D. L'analyse des profils ne lui a pas permis d'observer une réduction significative des CFP chez les mutants par comparaison avec leur pendant normal. Cependant, chez le mutant *cdc13-2* (voir section 6.3.2), elle a observé un profil suggérant que sur le chromosome artificiel la réplication est initiée par les télomères plutôt qu'à son origine de réplication interne. *CDC13* encode une protéine essentielle associée au simple brin G-riche télomérique et impliquée dans la protection et la coordination de la réplication des télomères. Ce projet visait à confirmer les observations préliminaires de Julie Parenteau.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souches et plasmides

La souche utilisée est MVL26A (*MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ1 his3-Δ200 leu2-Δ1 cdc13-2^{est2}*), gracieuseté de V. Lundblad (Lendvay et al., 1996). Cette souche contient le plasmide pVL438 et le chromosome linéaire pRW11. pVL438 (Evans et Lundblad, 1999) provient de l'insertion du gène *CDC13* dans le site de clonage multiple de pRS316 et porte un marqueur de sélection nutritionnel *URA3*. pRW11L, qui contient un marqueur *LEU2* et comporte à chaque extrémité 280 pb de répétitions télomériques, provient de la digestion de pRW11 par l'enzyme de restriction *Bam*HI (Parenteau, 2002). À toute fin pratique, MVL26A se comporte comme une souche sauvage puisque l'expression plasmidique de *CDC13* permet de maintenir les télomères stables malgré le défaut associé à *cdc13-2* au locus génomique. Cette souche devient effectivement mutante suite à la contre-sélection de pVL438 (voir plus bas).

Milieux de culture

La croissance des levures se fait dans un milieu synthétique complet (YC) contenant 0.12% de YNB (Yeast nitrogen base, Difco), des sels inorganiques (0.5% de sulfate d'ammonium, 1% d'acide succinique, 0.6% de NaOH), des acides aminés et vitamines nécessaires, ainsi que du glucose à 2%. Au besoin, les milieux ont été solidifiés par ajout de 2% d'agar. Les levures portant le gène *URA3* convertissent le 5-FOA en fluoro-déoxyuridine, une substance toxique. La

croissance sur un milieu solide contenant 0.1% de 5-FOA a été mise à contribution pour sélectionner les colonies ayant perdu leur plasmide doté du marqueur *URA3*, donc devenues mutantes (Boeke et al., 1987). La souche sauvage et sa version mutante, MVL26A, ont été respectivement inoculées dans du milieu YC et YC sans leucine (YC-leu). Le retrait de la leucine permet le maintien de pRW11L.

Préparation de l'ADN

Des cultures de 50 mL ont été incubées à 30°C, jusqu'à une densité optique de 0.8 à 660nm. pRW11L a été extrait par la méthode de « Hirt » (Livingston et Kupfer, 1977). Brièvement, les cellules sont récoltées et transformées en sphéroplastes dans un tampon contenant 0.3 mg/mL de zymolyase et 10 mM β -mercaptoéthanol. Les sphéroplastes sont lysés dans un tampon contenant 2% de SDS et par ajout de NaCl à 1M. Après élimination des débris cellulaires, l'ADN est extrait au phénol/chloroforme, précipité à l'éthanol et resuspendu dans du TE.

Gels 2D et transfert par Southern

L'ADN extrait des différentes souches est séparé en gel 2D en conditions neutre/neutre tel que décrit précédemment (Dandjinou et al., 2004a). Le transfert sur membrane de nylon et l'hybridation sont réalisés selon la méthode décrite par Wellinger et al., 1993a. L'ADN de PVZ1 a été marqué par extension d'amorces aléatoires (Henikoff et Eghtedarzadeh, 1987) et utilisé comme sonde ciblant pRW11L. pVZ1 est un vecteur bactérien dérivé, à l'instar de pRW11L, de pBS+ (Stratagene).

RÉSULTATS

L'absence de *CDC13* ne provoque pas la réplication d'un chromosome artificiel par l'extrémité. Chez la levure *S. cerevisiae*, les chromosomes sont normalement répliqués grâce à une fourche de réplication qui prend naissance au niveau des ARS (Autonomously Replicating Sequences) et se propage jusqu'aux télomères. Pour contrebalancer les pertes de séquences associées au problème réplcatif terminal (Figure 3), les télomères sont répliqués *de novo* par la télomérase. L'extrémité franche résultant de la réplication du brin avancé aux télomères est vraisemblablement transformée en de longues extensions 3' G-riche en fin de la phase S (Wellinger et al., 1993a). Chez un mutant *cdc13-2*, la télomérase n'est pas recrutée au sein du complexe télosomal. Chez ce mutant, le fait que l'initiation de la réplication d'un chromosome se fasse préférentiellement par les télomères plutôt que par un ARS interne est une situation anormale que nous voulions investiguer par la technique du gel 2D. Dans une souche normale, un chromosome contenant une origine de réplication en position centrale forme des intermédiaires de réplication selon le profil en « bulle » indiqué à la Figure 10. Par contre, si l'origine de réplication se trouve à l'extrémité du fragment analysé, on observe un profil de type « Y » (Figure 10). Lorsque l'origine de réplication est excentrée, le profil de réplication est intermédiaire entre le profil « bulle » et le profil « Y » et appelé « bulle à Y » (Figure 10). Dans cette étude portant sur l'effet de la mutation *cdc13-2* sur la réplication nous avons utilisé pRW11L, un chromosome artificiel comportant une origine de réplication (ARSH4) en position

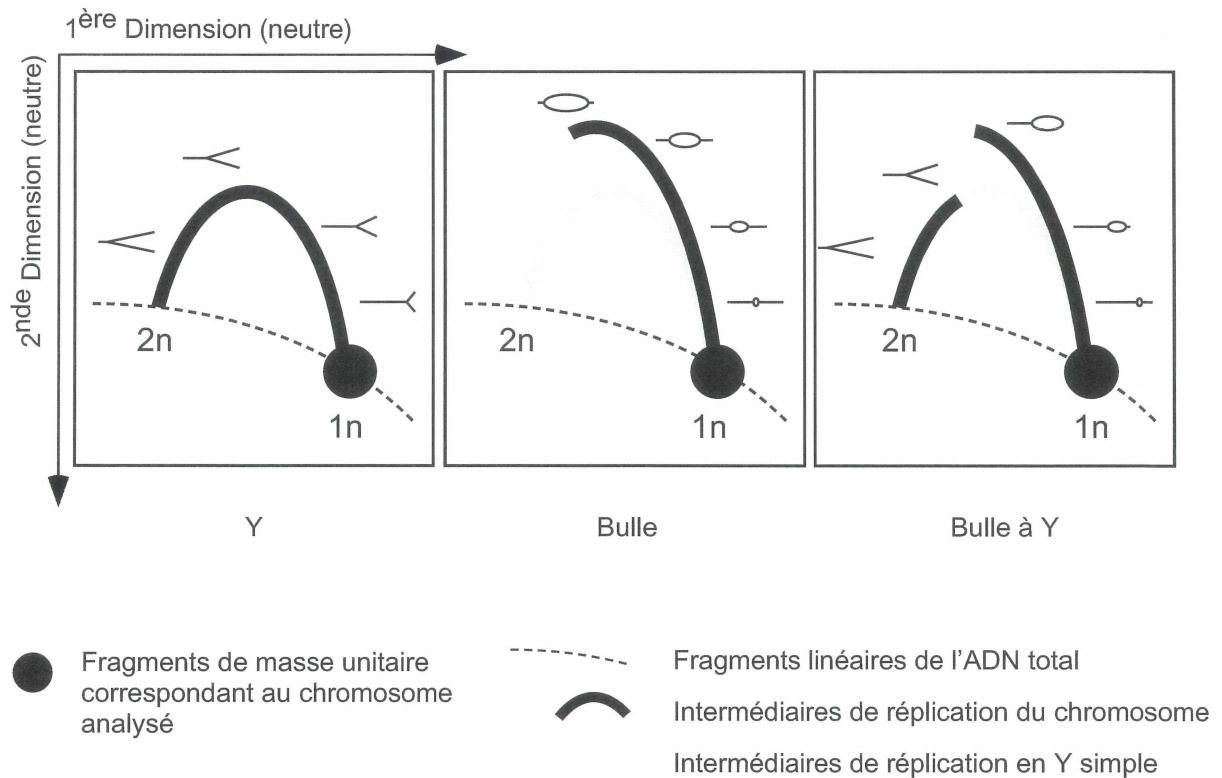


Figure 10. Représentation schématique de divers profils de réplication en gel 2D d'un chromosome linéaire en fonction de la position de l'origine. L'oval noir (le "point 1n") représente l'ADN double brin du chromosome analysé. Un chromosome dépourvu d'origine de réplication donnerait uniquement ce signal. Le profil de migration attendu suite à l'hybridation d'une sonde d'ADN spécifique au chromosome en réplication dépend de la position de l'origine et se traduit par des arcs de forme caractéristique (lignes noires). Les intermédiaires de réplication correspondants sont représentés au-dessus des arcs. Les arcs gris représentent le profil des intermédiaires Y simple, et sont inclus à titre comparatif. L'arc en pointillé contient un amalgame de fragments linéaires de l'ADN total. Le point 2n correspond aux fragments ayant (presque) le double de la masse du fragment d'ADN analysé.

asymétrique (Figure 11). Tel que prévu, le plasmide pRW11L se réplique selon le profil « bulle à Y » dans une souche de type sauvage *CDC13* (Figure 12). Dans la souche MVL26A, pRW11L se réplique également selon le profil « bulle à Y » (Figure 12). L'analyse en gel 2D ne met pas en évidence une réplication aberrante du chromosome artificiel par les télomères attribuable au défaut de *cdc13-2*. La protéine Cdc13p ne joue donc pas un rôle notable dans une éventuelle initiation de la réplication aux télomères.

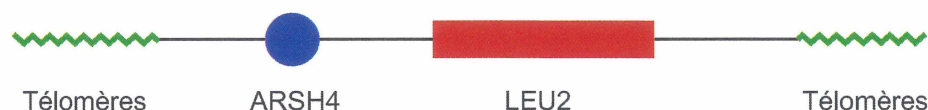


Figure 11. Schématisation du chromosome linéaire pRW11L. La linéarisation du plasmide pRW11 par digestion avec l'enzyme de restriction *Bam*HI a permis de générer le chromosome linéaire pRW11L. pRW11L comporte à chaque extrémité 280 paires de bases de répétitions télomériques et un marqueur nutritionnel LEU2 pour le maintien dans la levure. Le chromosome linéaire pRW11L est normalement répliqué à partir d'une origine ARSH4. La représentation n'est pas à l'échelle. La sonde utilisée est pVZ1 (voir texte).

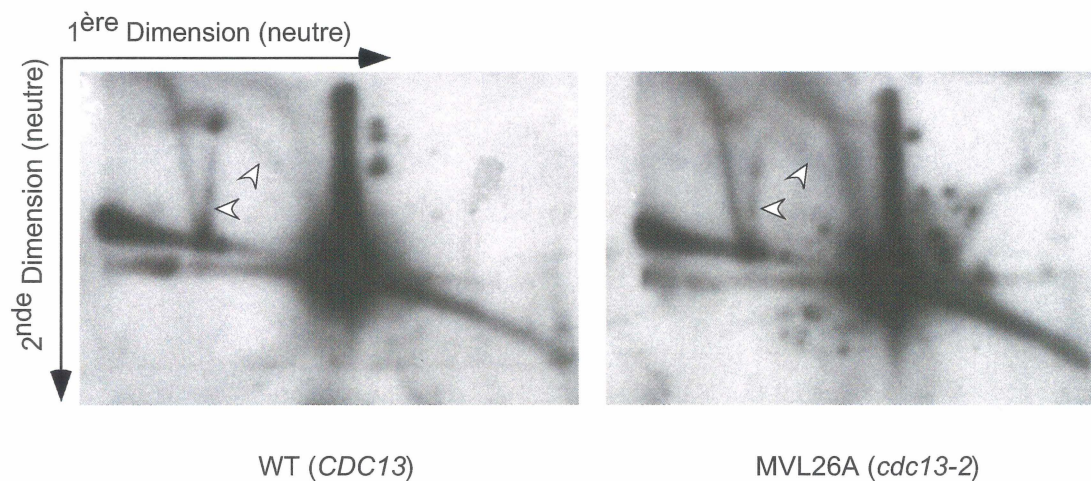


Figure 12. Mode de réplication du chromosome artificiel pRW11L chez le mutant *cdc13-2*. L'ADN des cellules de type sauvage (*CDC13*) ou MVL26A (*cdc13-2*), contenant le chromosome artificiel pRW11L a été analysé par gel 2D. La direction de migration des intermédiaires est indiquée par une flèche. Le profil de réplication en arc "bulle à Y" est indiqué par des pointes. La sonde utilisée est pVZ1 (voir texte).

CHAPITRE II

Identification de gènes dont la surexpression supprime le phénotype de sénescence associé à l'absence d'activité télomérase et de recombinaison homologue.

Préambule

Pour identifier de nouvelles voies de maintien des télomères chez la levure, nous avons utilisé une souche chez laquelle toute activité de maintien des télomères a été abolie suite à la délétion génomique des gènes *TLC1* et *RAD52* (*tlc1 rad52*). Cette souche est cependant maintenue en fournissant les gènes absents du loci génomique sur un plasmide centromérique contenant un marqueur uracile. Par contre-sélection de ce marqueur sur un milieu contenant du 5'-FOA nous obtenons au bout de deux à trois jours des colonies formées chacune à partir d'une cellule effectivement mutantes (*tlc1 rad52*). Grâce à des cultures liquides successives, nous avons déterminé la cinétique de croissance de cette souche et analysé la dynamique de ses télomères. Nous avons également introduit dans les souches *tlc1 rad52* une librairie de surexpression génomique de levure, bien avant l'apparition de la sénescence, de façon à identifier des gènes et de caractériser les mécanismes contribuant à la survie.

Objectif du projet

Puisque la majorité des cellules cancéreuses humaines ont réactivé la télomérase afin de maintenir leurs télomères, l'inactivation thérapeutique de l'enzyme paraissait une stratégie anti-cancer prometteuse. Cependant, le fait qu'une faible proportion de ces cellules maintient les télomères grâce à des mécanismes alternatifs (ALT), vraisemblablement basés sur la recombinaison, pourrait réduire l'efficacité de l'approche anti-télomérase (voir Introduction, section 7). Chez la levure *S. cerevisiae*, le maintien des télomères repose principalement sur l'expression constitutive de la télomérase. Cependant, une souche de levure dont l'activité télomérase a été abolie, par exemple par délétion de *TLC1* (le gène encodant pour la composante ARN, TLC1), peut maintenir ses télomères en utilisant la recombinaison homologue contrôlée par *RAD52* (voir Figure 9). Cette situation, qui pourrait s'apparenter à celle des cellules ALT, nous sert de modèle de base pour tester l'existence de mécanismes additionnels de maintien des télomères. Le but de ce projet est d'identifier des gènes capables de supprimer le phénotype de mort massive associée à l'absence des deux mécanismes de maintien des télomères connus.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Plasmides et librairie de surexpression génomique

Le plasmide centromérique pAZ1RAD52 construit par Pascale Labrecque, a été généré en plusieurs étapes. Le plasmide pAZ1 (Beeler et al., 1994), un dérivé du vecteur pRS316 (Sikorski et Hieter, 1989) contenant les gènes *TLC1* et *URA3*, a été digéré par *XhoI* et traité à la Klenow pour générer des extrémités franches. Le fragment ainsi produit a servi à sous-cloner un fragment de restriction *Sall* de 3.3 kpb contenant le gène *RAD52* pour générer pAZ1RAD52. Le fragment *Sall* était originellement présent sur le plasmide pVL191 (gracieuseté de V. Lundblad, données non publiées) par clonage au site *Sall* du vecteur YEp24 (Botstein et al., 1979). Le plasmide de délétion pUC8R52HIS a également été construit par Pascale Labrecque en plusieurs étapes. Le plasmide pUC8R52 a d'abord été généré par insertion du fragment *Sall* de 3.3 kpb, provenant de pVL191 et contenant le gène *RAD52*, dans le vecteur pUC8 (Vieira et Messing, 1982). pUC8R52 a par la suite subi une digestion partielle, puis traité à la nucléase du haricot mungo (mung bean) de façon à supprimer le site *SphI* le plus externe, générant le plasmide pUC8RAD52S. La double digestion de pUC8RAD52S par *ClaI* et *SphI* a permis de retirer la région centrale de *RAD52*, laissant des séquences de 1.2 et 0.9 kpb respectivement en amont et en aval du fragment retiré. Le fragment résultant a été utilisé comme vecteur pour un fragment de 1.6 kpb contenant le gène *HIS3*, obtenu par digestion du plasmide pHIS3 (fragment *BamHI* de *HIS3* cloné dans pUC9) par *BamHI* et traitement à la Klenow.

La librairie de surexpression des gènes de la levure (obtenue de K. Runge) a été créée par digestion de l'ADN génomique de *S. cerevisiae* avec *Sau3AI* et insertion des fragments de ~10 kpb dans le site *BamHI* du vecteur YEp24. Les plasmides résultant ont servi à transformer une souche de *E. coli* au cours de trois expériences séparées de façon à produire trois lots indépendants (Carlson et Botstein, 1982) nommées L1 (1.4 µg/µL), L2 (1.4 µg/µL) et L3 (0.6 µg/µL). La probabilité de retrouver le gène d'intérêt est de 95% en criblant 7500 transformants (K. Runge, communication personnelle).

Souches

Lucie Laliberté a interrompu le gène *RAD52* avec le marqueur *HIS3* à un des loci génomiques de la souche UCC3535 (gracieuseté de M. Singer et D. Gottschling, données non publiées) par transformation d'un fragment *Sall* provenant de pUC8R52S, pour générer la souche LLYD1 (*MAT α* /ura3-52/ura3-52 *lys2-801/lys2-801 ade2-101/ade2-101 trp1- Δ 1/trp1- Δ 1 his3- Δ 200/his3- Δ 200 leu2- Δ 1/leu2- Δ 1 DIA5-1/DIA5-1 TLC1/*tlc1::LEU2 RAD52/rad52::HIS3*). DIA5-1 réfère à l'intégration dirigée du gène *ADE2* juste avant les séquences télomériques du chromosome V-R. Lucie Laliberté a également transformé LLYD1 avec le plasmide pAZ1RAD52, sporulé les cellules et disséqué les tétrades de façon à isoler les spores Leu⁺/His⁺ contenant la double délétion *tlc1 rad52*. LLY15 (*MAT α* ura3-52 *lys2-801 ade2-101 trp1- Δ 1 his3- Δ 200 leu2- Δ 1 VR-ADE2-T *tlc1::LEU2 rad52::HIS3*), une des spores obtenues a servi de souche de départ pour les expériences effectuées lors de cette étude. À toute fin pratique, la souche LLY15**

possède tous les attributs d'une souche de type sauvage puisque les télomères sont maintenus à une longueur normale grâce à la présence du plasmide pAZ1RAD52. LLY15 devient effectivement mutante pour *TLC1* et *RAD52* suite à la contre-sélection du plasmide portant un marqueur *URA3* sur pétris contenant de l'acide 5-fluoro-orotique (5-FOA) (Boeke et al., 1987). Suite à la perte du plasmide pAZ1RAD52, nous avons vérifié par analyse Southern que les gènes *TLC1* et *RAD52* sont bien absents de leurs loci génomiques respectifs.

Milieux de culture

La croissance des levures se fait dans du milieu YC (voir Matériel et méthodes, chapitre I) ou dans du milieu YP supplémenté avec 2% de glucose comme source de carbone. Le cas échéant, les milieux ont été solidifiés par ajout de 2% d'agar. À la différence du milieu YC, le milieu YP est un bouillon dont la composition chimique exacte n'est pas définie. Ce milieu est composé notamment d'extraits de levure et de peptones (produits de digestion enzymatique de protéines animales).

Détermination de la cinétique de croissance

Pour l'étude de la cinétique de croissance, une colonie de la souche à étudier est transférée dans 5 ml de milieu synthétique complet (YC) ou de milieu riche (YP) et incubée à 30°C. Toutes les 24 heures, la densité optique des cultures est mesurée et chaque culture diluée à 10^6 cellules par mL dans un volume total de 5 mL de milieu frais, de façon à assurer une croissance continue. Ces dilutions

successives sont effectuées pendant 100 à 200 divisions cellulaires (générations). Le nombre de générations g , effectuées par une cellule entre deux inoculations est calculé grâce à la formule suivante: $g = 3.3 (\log_{10} N - \log_{10} N_0)$ où N_0 et N correspondent respectivement au nombre de cellules inoculées et récoltées. La souche mutante *tlc1 rad52* a initialement passé 3 à 4 jours sur milieu 5-FOA afin de sélectionner les colonies Ura⁻ et forme une colonie d'à peu près 1mm de diamètre (10^7 cellules), ce qui correspond à environ 20 générations additionnelles (g_0). Le nombre total de générations G effectuées par une cellule correspond à: $G = g_0 + \sum g$. La souche de type sauvage isogénique a été inoculée en parallèle dans le milieu synthétique approprié.

Transformation et criblage de la librairie

Les colonies de la souche LLYD1, fraîchement poussées 20 générations sur 5-FOA, ont été inoculées dans 5 mL de milieu pour 10 générations additionnelles. Cette culture a été transformée avec 100 ng de librairie de surexpression des gènes de levure, bien avant d'atteindre la fenêtre de mort massive associée à l'absence de télomérase et de recombinaison homologue, en utilisant une méthode à l'acétate de lithium hautement efficace (Gietz et al., 1995).

Le nombre de transformants nécessaires pour couvrir trois fois la librairie est estimé à 22500. Le taux d'insertion dans la librairie L3, tel que déterminé par transformation bactérienne et analyse de clones indépendants sur gel, est de 60%, ce qui revient à cribler environ 38000 transformants.

Suite à la transformation de la souche LLYD1, les cellules sont étalées sur milieu synthétique YC-uracile pour 3 jours, soit environ 20 générations. Afin de déterminer la capacité du plasmide à contrecarrer la sénescence, chaque transformant a par la suite été successivement strié sur milieu YC-uracile pour environ 100 générations. Lorsque des cellules passent le cap prédéterminé de la sénescence, elles sont successivement striées sur milieu 5'-FOA (pour faire perdre le plasmide de complémentation qui, *a priori*, permet la survie), puis sur milieu YC (pour observer l'éventuelle apparition de la sénescence). Ce test permet d'établir la corrélation entre la survie et la présence du plasmide. Trois colonies indépendantes issues de la transformation ont également été inoculées dans 5 mL de milieu YC-uracile afin de déterminer la cinétique de croissance.

Préparation de l'ADN et analyse de la longueur des télomères

Les cultures obtenues après un nombre déterminé de générations dans 5 mL de milieu liquide ont été transférées dans un tube Falcon de 15 mL, culottées, rincées, et l'ADN génomique a été extrait en utilisant une version modifiée de la méthode des billes de verre (Hoffman et Winston, 1987). Brièvement, le culot a été mis en suspension dans 200 µL de tampon de broyage (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) et 300 µL de phénol/chloroforme. Après l'introduction des billes de verre lavées à l'acide, 2 mm en dessous du ménisque, le broyage des cellules s'est effectué en 6 rondes de vortexage à vitesse maximale pendant 30 s, suivi de 30 s d'incubation sur glace. Le liquide emprisonné entre les billes de verre suite au broyage des cellules et au

rinçage des billes avec 200 μ L de TE (10 mM Tris-base, pH 7.5, 1 mM EDTA) a été transféré dans un microtube propre à l'aide d'une pipette automatique. Suite à la centrifugation à vitesse maximale pendant 5 min à 4°C, la phase aqueuse a été délicatement transférée dans un microtube neuf, traitée à la RNase A à une concentration finale de 75 μ g/mL à 37°C pendant 30 min. L'ADN a été précipité à l'éthanol et mis en suspension dans 40 μ L de TE et digéré par *Xho*I pour libérer les fragments terminaux de restriction. 1 μ g de l'ADN digéré a été séparé dans un gel d'agarose 0.8% de 20 cm de long et transféré par capillarité sur une membrane de nylon (Amersham Hybond-N+). Les bandes télomériques ont été visualisées par hybridation à 42°C avec une sonde constituée de séquences télomériques de levure et marquée par extension d'amorces aléatoires (Henikoff et Egghedarzadeh, 1987).

RÉSULTATS

La surproduction de Net1p empêche l'apparition de la sénescence. Chez *S. cerevisiae*, lorsque l'élongation par la télomérase est inactivée, les télomères peuvent être maintenus par la recombinaison homologe contrôlée par *RAD52*. En l'absence de ces deux voies, aucun survivant n'est généré. Les télomères raccourcissent à l'extrême au bout de 50 générations et s'apparentent à des DSBs à cause de la perte de leur structure protectrice. Cette situation impose un arrêt du cycle cellulaire à la faveur duquel les dommages sont réparés par NHEJ. Ce mode de résolution entraîne les chromosomes dans des cycles de fusions-cassures et aboutit à l'instabilité génomique. L'accumulation rapide de dommages, combinée à la forte pression de sélection, ne facilite probablement pas la mise en œuvre efficace de mécanismes de survie.

L'objectif premier de ce projet consistait à mettre en évidence de nouvelles voies de maintien de l'homéostasie de la longueur des télomères. Comme ces mécanismes additionnels peuvent être constitutivement réprimés, nous avons pensé que la surexpression de facteurs clés impliqués dans ces éventuelles voies pourrait faciliter leur mise en œuvre. Notre stratégie comportait plusieurs étapes. Dans un premier temps, nous avons transformé la souche LLY15 (*tlc1 rad52*) à environ 20 générations (bien avant l'apparition de la sénescence) avec une librairie de surexpression de gènes de levure. Par la suite, nous avons effectué des passages successifs de façon à dépasser le nombre prédéterminé de divisions cellulaires pour la sénescence, soit 50 générations. Les plasmides

conférant aux souches LLY15 une survie au delà de 100 générations ont été isolés et les gènes responsables caractérisés. Le criblage partiel de la librairie L3 a permis de récupérer six clones dont la surexpression supprime la sénescence. Les fragments chromosomiques portés par ces clones contiennent des gènes connus et des ORFs non caractérisés (Tableau 4). Sur un de ces plasmides, le gène responsable de la survie a été circonscrit à *NET1*.

Le produit du gène *NET1* est une phosphoprotéine de 128.5 kD (kilodalton) impliquée dans la répression aux loci *HMR* et jouant un rôle central dans la régulation de l'entrée en mitose. Nous avons observé que la surexproduction de Net1p dans la souche LLY15 se traduit par une croissance lente mais soutenue des cellules, au moins jusqu'à 200 générations. L'analyse des télomères de ces survivants en Southern montre un profil inhabituel. Jusqu'à 75 générations, les télomères sont maintenus courts (~1.1 kpb) et on n'observe pas le profil de réarrangement caractéristique de la recombinaison chez les survivants du type II (Figure 13, pistes 2 à 5). À partir de 80 générations, les signaux télomériques terminaux sont fortement réduits et substitués par un signal diffus en haut du gel (Figure 13, pistes 6 et 7). Un profil similaire est observé par hybridation d'une sonde Y' (données non-montrées), indiquant que la survie ne se fait pas selon le mode de recombinaison de type I (amplification des séquences Y'). Ces résultats sur la survie associée à la surproduction de Net1p ont été obtenus avant ceux des expériences sur la caractérisation des souches *tlc1 rad52* (voir sections suivantes). Ces dernières données incitent à une nouvelle analyse du rôle de net1p sur la survie. Bien que la présence de *RAD52* n'ait pas été directement

Clone	Taille insert (kpb)	Chromosome	Genes
8	4.5	IV	<i>RAD9</i>
12	10	X	<i>ISC3</i> , <i>NET1*</i>
26	>0.8	V	<i>RIP1</i> , <i>GEA2</i> , <i>URA3</i>
102	9.0	III	<i>HMLα</i>
112	>0.8	V	?
130	8	III	<i>BUD5</i> , <i>MATα</i>

Tableau 4. Gènes repêchés lors du ciblage de la librairie de surexpression génomique pour des survivants *tlc1 rad52* (LLY15). Les gènes en rouge sont des candidats possibles à la suppression de la sénescence. Un point d'interrogation signifie qu'aucun gène n'a été identifié sur le fragment. Une astérisque indique que le gène candidat a été isolé et testé pour sa capacité à promouvoir la survie.

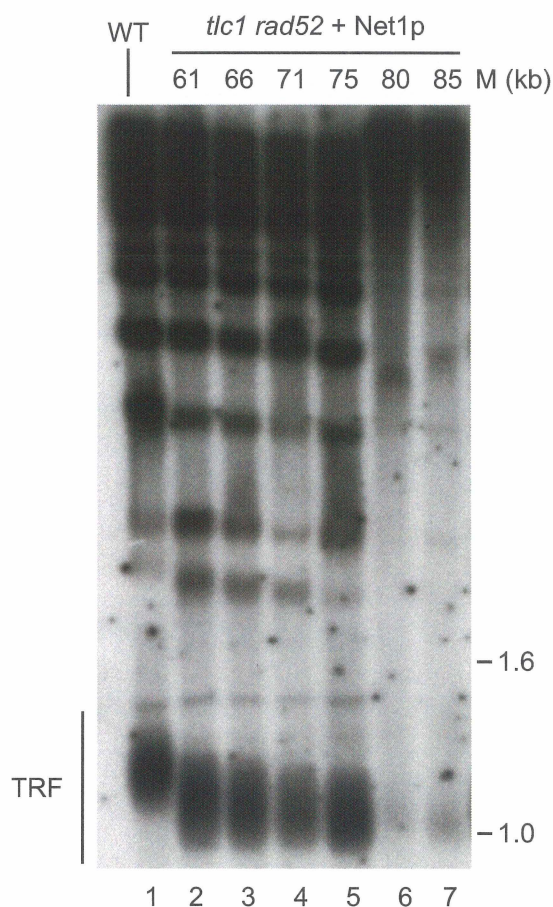


Figure 13. Effets de la surexpression de Net1p sur le maintien des télomères des souches *tlc1 rad52* (LLY15). La souche *tlc1 rad52* contenant le plasmide pDW12 (2 μ m *NET1*) a été prélevée après 20 générations (pétris de transformation), inoculée en milieu liquide et diluée successivement jusqu'à 100 générations. L'ADN génomique a été préparé à partir des cultures à 65, 70, 75, 80, 85 générations, digéré par *Xho* en vue de libérer les TRFs (voir Figure 1) et analysé par transfert Southern avec une sonde télomérique. Une souche *tlc1 rad52* contenant le plasmide pAZ1RAD52 (CEN *TLC1 RAD52*) (WT) a été traitée de façon identique et sert de contrôle positif.

testées dans les souches *tlc1 rad52* surexprimant *NET1*, il se pourrait que la suppression de la phase de sénescence par surproduction de Net1p se soit produite dans un contexte *tlc1* et non *tlc1 rad52*.

Génération de survivants dans les souches *tlc1 rad52*. Parallèlement au criblage décrit dans la section précédente, nous avons voulu analyser les caractéristiques de croissance de la souche LLY15. Cette souche haploïde dérive de la sporulation d'une souche diploïde LLYD1 contenant le plasmide pAZ1RAD52. Suite à la perte du plasmide pAZ1RAD52, la souche LLY15 devient effectivement mutante (*tlc1 rad52*) et a passé environ 20 générations sans les gènes *TLC1* et *RAD52* (voir matériel et méthodes). Plusieurs colonies de la souche LLY15 ont été inoculées individuellement en milieu liquide et propagées en continu par dilutions successives (Figure 14). La souche LLY15 transformée par le plasmide pAZ1RAD52 se comporte comme une souche de type sauvage (Figure 14, WT) et se divise indéfiniment avec une vitesse constante. Par contre, dans la souche isogénique dépourvue du gène *TLC1*, la télomérase est inactive (Figure 14, *tlc1*). Des études précédentes ont montré que les souches dépourvues de télomérase arrivent à échapper à la sénescence en maintenant leurs télomères par la recombinaison homologue contrôlée par *RAD52*. La croissance en milieu liquide de ces souches se caractérise par une courbe en trois phases: (1) jusqu'à environ 50 générations on observe une phase de pré-sénescence au cours de laquelle les télomères raccourcissent graduellement sans conséquences notable sur la croissance; (2) cette phase est suivie de la sénescence matérialisée par un

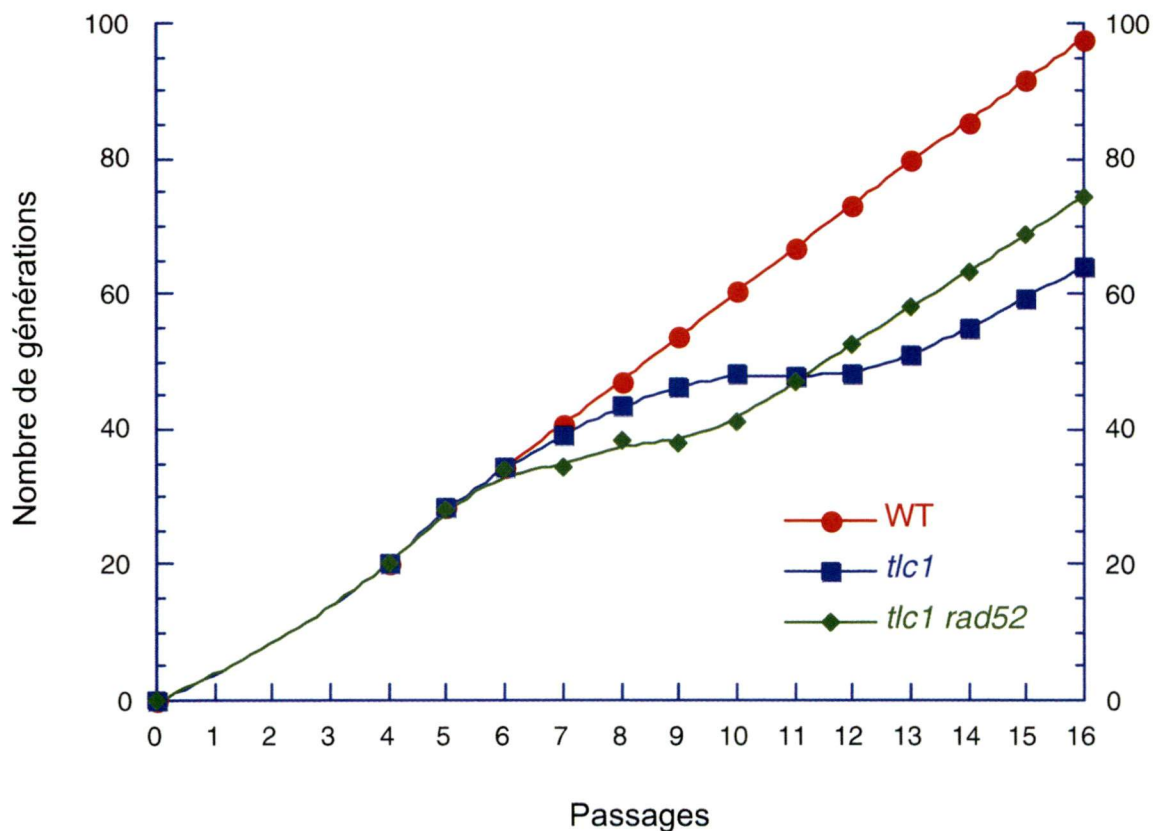


Figure 14. Génération de survivants dans les souches *tlc1 rad52* (LLY15). Une souche *tlc1 rad52* a été contre-sélectionnée sur milieu 5-FOA pour la perte du plasmide pAZ1RAD52, inoculée en milieu liquide. Des passages ont été effectués toutes les 24 heures par dilutions successives jusqu'à 100 générations. Le nombre de générations a été déterminé avant chaque dilution. Les souches isogéniques dépourvues de télomérase (*tlc1*) ou de type sauvage (WT) ont été traitées de façon identique et servent de contrôles.

plateau indiquant la mort des cellules; (3) une phase post-sénescence au cours de laquelle une minorité des cellules recommence à se diviser constamment et indéfiniment. Nous nous attendions à ce que la souche *tlc1 rad52* ne sorte pas du plateau de sénescence. Mais contre toute attente, nous avons observé une reprise de la croissance dans une majorité de cas. L'analyse des télomères (Figure 15) montre que ces survivants *tlc1 rad52* maintiennent leurs télomères par un mode de réarrangement similaire au type II (piste 4). En effectuant des passages de CSHY76 (voir Matériel et méthodes, chapitre III), une souche *tlc1 rad52* bien établie, nous n'avons pas observé de survivants. Ce résultat va dans le sens des observations faites pas d'autres groupes et impose une réévaluation des données obtenues à partir de la souche LLY15.

Les survivants *tlc1 rad52* ont acquis le gène *RAD52*. En plus d'avoir un profil de recombinaison similaire aux souches *tlc1*, nous avons observé que la souche LLY15 est résistante aux agents de dommages à l'ADN comme la bléomycine et le MMS (méthyl méthanesulfonate; données non montrées). Cette résistance aux agents de dommage est caractéristique des souches compétentes pour la recombinaison homologue. Afin de nous assurer que les survivants *tlc1 rad52* que nous avons précédemment obtenu ne maintiennent pas leurs télomères grâce à un mécanisme dépendant de *RAD52*, nous avons à nouveau vérifié que ce gène est bien absent. Nous avons analysé l'ADN génomique extrait de plusieurs cultures indépendantes de survivants *tlc1 rad52* par Southern avec une sonde *RAD52* (Figure 16). Chez le contrôle positif (WT, piste 6), on observe la bande de

restriction *SspI* attendue à 2014 pb. De façon inattendue, cette même bande est aussi présente chez tous les survivants analysés, indiquant que le gène *RAD52* s'est ré-intégré à son locus génomique. Le signal additionnel à environ 2700 pb correspond bien au profil de digestion par *SspI* du locus de *RAD52* inactivé par *HIS3*. Le mécanisme de réapparition de *RAD52* reste indéterminé. Les résultats décrits précédemment, concernant la survie des souches *tlc1 rad52* grâce à la surproduction de Net1p, doivent donc être ré-interprétés à la lumière de la ré-émergence du gène *RAD52*. La présence inattendue de *RAD52* laisse néanmoins entrevoir des mécanismes de survie basés sur la facilitation de la recombinaison homologue (voir discussion).

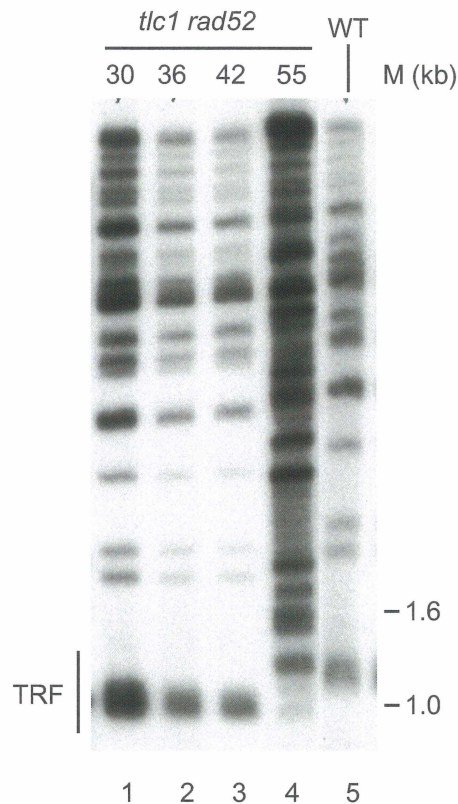


Figure 15. Maintien des télomères chez les survivants *tlc1 rad52* (LLY15). L'ADN génomique provenant des souches *tlc1 rad52* a été préparé à partir des cultures à 30, 36, 42, et 55 générations, digéré par *XhoI* en vue de libérer les TRFs (voir Figure 1) et analysé par transfert Southern avec une sonde télomérique. Une souche *tlc1 rad52* contenant le plasmide pAZ1RAD52 (CEN *TLC1 RAD52*) (WT) a été traitée de façon identique et sert de contrôle positif.

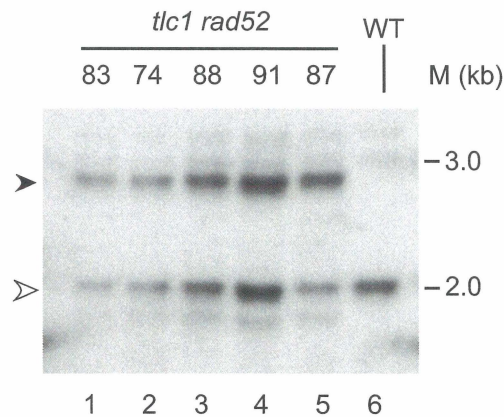


Figure 16. Vérification de la présence de *RAD52* chez les survivants *tlc1 rad52* (LLY15). L'ADN génomique provenant de différents survivants *tlc1 rad52* a été préparé à partir des cultures aux générations indiquées, digéré par *SspI* et analysé par transfert Southern avec une sonde *RAD52*. La souche isogénique sauvage (WT) a été traitée de façon identique et sert de contrôle positif. Le fragment de *RAD52* dans une souche sauvage est de 2014 pb (pointe blanche). Le fragment provenant de l'interruption du gène *RAD52* par le marqueur *HIS3* est d'environ 2700 pb (pointe noire).

CHAPITRE III

Dandjinou, A. T., Lévesque, N., Larose, S., Lucier, J-F., Abou Elela, S., et Wellinger, R. J. (2004). A phylogenetically based secondary structure for the yeast telomerase RNA. *Current Biology* 14(13):1148-1158.

Préambule

Ce manuscrit rapporte la détermination de la structure secondaire de l'ARN de la télomérase chez la levure *S. cerevisiae*. En utilisant la stratégie de PCR basée sur les « voisins immédiats », nous avons cloné 7 ARNs de télomérase provenant d'espèces du groupe des *Saccharomyces* « *Sensu stricto* », étroitement apparentées à *S. cerevisiae* (Figure 17). La structure qui émerge des analyses de covariation et des analyses biochimiques met en évidence 7 domaines conservés. Ces régions contiennent des structures locales précédemment identifiées, mais aussi de nouveaux éléments structuraux constituant des sites potentiels d'association à des facteurs impliqués dans la maturation, l'assemblage et la régulation de la télomérase. De plus, la comparaison de la structure secondaire de l'ARN de la télomérase de levure avec celle des ciliés et des vertébrés révèle le caractère ubiquitaire d'un pseudonoeud de type H au sein d'un noyau central conservé.

J'ai réalisé le clonage de tous les homologues de TLC1, les analyses phylogénétiques, l'analyse informatique, les analyses biochimiques de l'ARN de TLC1 ainsi qu'une partie des tests de complémentation.

Objectif du projet

L'ARN de la télomérase joue un rôle catalytique et structural crucial au sein du complexe enzymatique. Contrairement aux ciliés et aux vertébrés, les données structurales présentement disponibles sur l'ARN de la télomérase chez la levure sont fragmentaires et ne permettent pas d'avoir une vue globale des interactions ARN-protéines au sein de la télomérase. Considérant que la levure est un outil génétique de choix, la détermination de la structure secondaire de TLC1 contribuera à mieux comprendre l'assemblage et la maturation de la télomérase. L'objectif de ce projet est d'établir une structure secondaire modèle pour TLC1 en utilisant l'approche phylogénétique consolidée par des analyses biochimiques. Une condition *sine qua non* pour atteindre cet objectif est d'accroître le bassin de séquences homologues disponibles à partir d'espèces apparentées dans l'évolution.

Title:

A secondary structure for the yeast telomerase RNA.

Alain T. Dandjinou, Nancy Lévesque, Stéphanie Larose, Jean-François Lucier, Sherif AbouElela and Raymund J. Wellinger*

Groupe ARN/RNA Group,
Department of Microbiology and Infectious Diseases
Faculty of Medicine
Université de Sherbrooke

3001 12th Ave N.
Sherbrooke, QC
J1H 5N4
Canada

*Corresponding author
Tel.: 819 564 5214
Fax.: 819 564 5392
Email: Raymund.Wellinger@Usherbrooke.ca

Running Head: Yeast telomerase RNA structure

SUMMARY

Background: Telomerase is a ribonucleoprotein complex whose RNA moiety dictates the addition of specific sequences onto chromosomes ends. While relevant for certain human genetic diseases, the contribution of the essential telomerase RNA to RNP assembly still remains unclear. Phylogenetic analyses of vertebrate and ciliate telomerase RNAs revealed conserved elements that potentially organize protein subunits for RNP function. In contrast, the yeast telomerase RNA could not be fitted to any known structural model and the limited number of known sequences from *Saccharomyces* species did not permit the prediction of a yeast specific conserved structure.

Results: We cloned and analyzed the complete telomerase RNA (TLC1) loci from all known *Saccharomyces* species belonging to the “sensu stricto” group. Complementation analyses in *S. cerevisiae* and end-mappings of mature RNAs ensured the relevance of the cloned sequences. Using phylogenetic comparative analysis coupled with in vitro enzymatic probing, we derived a secondary structure prediction of the *Saccharomyces cerevisiae* TLC1 RNA. This conserved secondary structure prediction includes a central domain that is likely to orchestrate DNA synthesis and at least two accessory domains important for RNA stability and telomerase recruitment. The structure also reveals a potential tertiary interaction between two loops in the central core.

Conclusion: The predicted secondary structure of the TLC1 RNA of *S. cerevisiae* reveals a distinct folding pattern featuring well separated but conserved functional

elements. The predicted structure now allows for a detailed and rationally designed study to the structure-function relationships within the telomerase RNP-complex in a genetically tractable system.

INTRODUCTION

Telomeres, the terminal portion of the linear eukaryotic chromosomes, are composed of specialized nucleoprotein complexes that ensure protection of chromosomal DNA [1, 2]. Telomeric DNA comprises specific short direct repeats and their maintenance is assured by a specialized ribonucleoparticle (RNP) called telomerase. Minimally, telomerase contains the catalytic protein component TERT (TElomerase Reverse Transcriptase; Est2p in yeast [3, 4] and an associated RNA moiety (TER: TElomerase RNA; TLC1 in yeast, [5, 6]). The addition of telomere-specific repeated sequences is templated by a small segment residing on this essential RNA moiety [5, 7]. In addition to this templating function, the TERT/telomerase RNA complex provides constitutive or transient binding sites for a variety of other proteins, some of which are essential for in vivo activity [4, 8, 9]. For humans, telomerase activation is closely associated with cellular immortalization and ultimately cancer development, but the clinical importance of telomerase extends beyond this role in cancer since several genetic diseases such as dyskeratosis congenita and aplastic anaemia have been associated with mutations in the RNA subunit of telomerase [10]. Therefore, the RNA component of telomerase may have additional and so far unknown roles in cellular metabolism which may be associated with RNP maturation.

In *Saccharomyces cerevisiae*, the telomerase RNA (TLC1) is about 1,200 bases long, transcribed by RNA polymerase II and matured through acquisition of a 5'-trimethylguanosine cap and in association with Sm-proteins [5, 11, 12]. Previous work based on mutagenesis, deletions and sequence comparisons between distant yeasts established a few functional elements of this RNA: an essential central portion of that is associated with TERT/Est2p [13], a conserved bulged stem that is important for Est1p association [14], a conserved short stem that serves as template boundary element [15], and a stem loop element that binds the Yku-complex [16, 17]. However, the global structure of the TLC1 RNA remained unknown, which hampers the understanding of the mechanism of the telomerase RNP biogenesis and function. Phylogenetic analysis of primary sequence comparisons is amongst the most powerful tools to arrive at a working model for the secondary structure of RNAs [18-21]. This approach has been successfully used to establish secondary structures of the ciliate and vertebrate telomerase RNAs [22-25]. However, for *Saccharomyces* species, the limited availability of sequences derived from evolutionary closely related species as well as the large size of the TLC1 RNA were major obstacles for a similar approach.

Here we report the cloning, sequencing and functional analysis of the TLC1 genes of all *Saccharomyces* species being part of the closely related “sensu stricto” group [26]. Individual pair-wise comparisons of the individual sequences to the *Saccharomyces cerevisiae* S288C RNA revealed homologies that range between 98% and 59%, which allowed a reliable sequence alignment and covariation analyses of base-pairs in predicted stems. Selected regions in the predicted structure were subsequently confirmed by biochemical mapping. The proposed secondary structure is consistent with

the previously established sub-elements and reveals a central domain that is likely to associate with TERT/Est2p to orchestrate DNA synthesis, as well as at least two accessory domains important for RNA stability and telomerase recruitment. Finally, a comparison of the proposed structure for the yeast RNA with those of the vertebrate and ciliate RNAs suggests that the central core element may have a conserved structural organization.

RESULTS AND DISCUSSION

Identification of new telomerase RNA genes of *Sacchromyces* species of the “sensu stricto” group.

In order to elucidate the secondary structure of telomerase RNA in *Saccharomyces cerevisiae*, we identified strains in which the RNA sequences are close enough to allow juxtaposition of homologous regions, but diverge sufficiently to allow for covariation rates adequate for structural prediction. Based on published sequence similarities, all species from the *Saccharomyces* “sensu stricto” group were selected [27]. These include *S. cerevisiae* S288C and its variant *S. cerevisiae* SK1, *S. paradoxus*, *S. cariocanus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, *S. bayanus*, and *S. pastorianus* [28]. *S. pastorianus*, which is thought to be a natural hybrid between *S. cerevisiae* and *S. bayanus* was included in order to increase sequence variability, thereby increasing chances of covariation [29]. Primary sequences of telomerase RNAs are known to diverge significantly, even between closely related species [22, 23] and a direct amplification of the sequences from the selected species proved unsuccessful. However, protein encoding sequences

bordering the TLC1 loci are more conserved and underlying DNA sequences could be predicted more reliably, particularly for stretches of highly conserved amino acids of the respective proteins [27]. We took advantage of this fact and the relative compactness of yeast genomes to clone the complete TLC1 loci from all the species mentioned above using this nearest neighbour-based strategy (see Experimental Procedures). The candidate homologues were inserted into pADCEN26, downstream an inserted transcription terminator region of the ADH1 gene. This system allows transcription of the presumptive RNA by its own promoter while preventing read-through transcription originating from upstream vector sequences; thus, only genes with functional promoters produced RNA from these vectors. In order to ensure that the cloned loci corresponded to functional TLC1 loci, constructs containing the various cloned TLC1 loci were introduced into a *S. cerevisiae* strain lacking its own TLC1 gene (Table 1). In this host, a disruption of both telomerase function by a deletion of the TLC1 gene and an abolition the major recombination pathway by deleting RAD52 leads to progressive telomere shortening with an incidental loss of viability after 40-50 generations, called senescence [30]. Haploid strains expressing a candidate TLC1 homologue but lacking both TLC1 and RAD52 genes (*tlc1/rad52*) were tested for their ability to grow past replicative senescence and to maintain telomere homeostasis (Table 1 and Experimental Procedures). Two independent clones of each candidate were restreaked for 100 generations, far beyond the pre-determined senescence point (see empty plasmid, the negative control in Table 1). The gene from *S. cerevisiae* (S288C; positive control, as well as SK1) and the candidate genes derived from *S. paradoxus*, *S. cariocanus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, and *S. pastorianus* were able to complement the TLC1

disruption. In contrast, the locus derived from *S. bayanus* did not (Table 1). Plasmid loss experiments confirmed that complementation was dependent on the introduced loci (Table 1). In addition to cell viability, the average length of the telomeric repeat DNA was also assessed in this experiment (data not shown). Consistent with the survival data, the telomeres in all complemented strains retained an overall structure similar to wild-type strains with no indication of recombination based maintenance. However, the actual average lengths of the repeat tracts in the individual strains were shortened to varying extent, the shortest stable telomeres being present in cells containing the *S. pastorianus* TLC1 locus (data not shown). These results are consistent with the cell survival phenotypes as the cells with the *S. pastorianus* TLC1 gene died most rapidly after plasmid loss (Table 1). We conclude that except for the *S. bayanus* locus, the cloned loci of all species can direct transcription of a complementing RNA in *S. cerevisiae*. Therefore, the heterologously expressed RNAs must mature and fold into a similar structure as the one of the host cells in order to be able to associate with the various endogenous *S. cerevisiae* proteins to form an active RNP. The incapacity of the *S. bayanus* locus clone to complement may reflect either a lack of RNA functionality and/or promoter incompatibility. In any case, an analysis of the recently sequenced *S. bayanus* genome revealed that the cloned sequence is the most likely candidate for the telomerase RNA [27].

RNA sizes and the mature 5'- and 3'-ends.

In *S. cerevisiae*, the TLC1 RNA is present in two distinct forms: a less abundant polyadenylated transcript and a much more abundant non-polyadenylated form of about

1,200 nucleotides (nt) [5, 11]. The non-polyadenylated species is thought to be the functional RNA present in the RNP and its 3'-end has been mapped to various positions after a Sm-protein binding element ([11, 31] and see below). Taking a previously proposed 5'-end for the *S. cerevisiae* RNA and the completely conserved Sm-binding site as markers, the aligned sequences derived from all species predicted RNA sizes ranging from about 1160 nt (*S. cerevisiae*, *S. cariocanus*, *S. paradoxus*) to 1220 nt (*S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, *S. bayanus*, *S. pastorianus*)(See supplemental Fig. S1). In order to establish whether such RNAs are indeed expressed in the various species, we performed Northern blots with RNA derived from all the species listed above (Fig. 1). A mix of species-specific probes revealed the presence of a major RNA band in all species and, in some cases, a minor band. The estimated sizes for the major bands coincide well with the predicted sizes derived from the sequencing efforts. We conclude that the cloned sequences are expressed in the particular species as RNAs of the predicted sizes, strongly suggesting that we indeed have the genes encoding the functional TLC1 RNAs of the corresponding species.

In order to properly align the telomerase RNA sequences, we mapped the *in vivo* 5'-ends of the TLC1 RNAs by primer extension using total cellular RNA from *S. cerevisiae* (S288C, SK1), *S. paradoxus*, *S. cariocanus*, *S. mikatae* and *S. kudriavzevii* (example for *S. cerevisiae* is shown in Fig. 2). Primer extensions were performed using species-specific radiolabeled primers that annealed 30-70 nucleotides downstream of the 5' terminus that was previously proposed for the *S. cerevisiae* RNA [5]. Surprisingly, the major band corresponding to the *S. cerevisiae* RNA 5'-end was mapped to a guanosine residue 10 nucleotides downstream of the previously proposed 5'-end (Fig. 2). This

major band is specific to the TLC1 RNA, since it was not observed when total RNA derived from a strain lacking the TLC1 RNA was used as a template (lane 3, Fig. 2). In addition, the observed transcription termination does not represent a premature stop of the reverse transcriptase, as no such stops are generated on an in vitro transcribed TLC1 RNA covering the same region (lane 2, Fig. 2). In addition, the position of the major band representing this mature 5'-end remained unchanged, irrelevant of the position of the primer used (data not shown). Therefore, we chose this nucleotide as the “+1” position of the *S. cerevisiae* TLC1 RNA. As expected, the major 5'-ends of the *S. paradoxus* and *S. cariocanus* TLC1 RNAs, the sequences of which are highly homologous to that of *S. cerevisiae* in this region, mapped to the same nucleotide position, indicating a conserved mature 5'-end for these three RNA species (Fig. S1 and data not shown). The determined 5'-ends of the *S. mikatae* and *S. kudriavzevii* RNAs are 17 and 20 nucleotides upstream with respect to the *S. cerevisiae* 5'-end. Curiously, in *S. cerevisiae*, a minor fraction of the TLC1 RNA molecules also have extended 5'-ends (lane 4, Fig. 2). It remains to be established whether these molecules are mature TMG-capped RNAs or potential processing intermediates. Inclusion of the extra nucleotides did not influence the overall folding of the complete RNA molecule derived from any of the species and for simplicity reasons, they were not incorporated in the structure proposed below. The 3' terminus of *S. cerevisiae* TLC1 RNA was previously shown to be located downstream the Sm-binding site [11, 31]. In order to compare the 3'-ends of *S. cerevisiae* with those of other species, we performed 3'-end mappings using RNase protection assays. The RNA probe covered the region from 61 nt upstream to 295 nt downstream relative to the *S. cerevisiae* Sm-site. As previously observed by

similar RNase protection assays [31], the major 3'-end of the *S. cerevisiae* TLC1 RNA is located in a run of uridine residues, about 10 nucleotides downstream of the Sm-site (Suppl. Fig. S1 and data not shown). However, we also detected minor bands indicating the presence of additional 3'-ends about 80 nucleotides further downstream (data not shown). These positions are consistent with previous 3'-end determinations using an RT-PCR method [11], and also with the sequences retrieved originally on cDNA clones [5]. The sequence around the Sm-site is 100% conserved in all species analyzed here, such that the alignment of the 3'-ends at this site can be made with high confidence. Therefore, we aligned the sequences at this major 3'-end located about 10 bases downstream of the SM-binding site for the prediction of the conserved TLC1 structure. In order to investigate the impact of the ~ 80 nucleotide-extension downstream of the Sm-site, we independently folded the RNAs containing this extension. This analysis demonstrated that the 3'-extension can fold into what appears to be a independent conserved structure by itself, but which does not influence or change the folding of the global structure reported in figure 3 (data not shown).

Taken together, our data establish the mature 5'-end of the TLC1 RNA and suggest that a major 3'-end is located about 10 nucleotides downstream of the conserved Sm-site. These anchor points allowed a robust sequence alignment of all RNAs and formed the basis for the structure prediction.

Establishment of a secondary structure model based on phylogenetic analysis.

In order to derive a secondary structure for the yeast telomerase RNA, we followed an iterative procedure consisting of sequence alignment, a computer-aided folding that

predicts thermodynamically stable helices, and covariation searches (see Experimental Procedures). A conserved region was defined as a region containing at least five nucleotides conserved in all species and harbouring gaps of no more than three consecutive nucleotides. There are about 17 such conserved regions in the TLC1 sequences (see Suppl. Fig. 1S). These regions include two blocks of complete identity that were expected: the first is the template region (5'-ACCACACCCACACA-3') that dictates the addition of telomeric sequences onto chromosome ends [5]. The second anticipated conserved sequence is the Sm-motif (see above; 5'-AAUUUUUGGAA-3') that binds Sm-proteins and is important for RNA stability [12, 32]. The overall similarities between the various RNAs and that of *S. cerevisiae* S288C ranged in between 59% (*S. pastorianus*) and 98% (*S. cerevisiae* SK1), which is within the optimal range for performing phylogenetic comparative analyses (see Supplemental Table S1; [33]). We note that this primary sequence divergence of the TLC1 RNAs of the species in the “sensu stricto” group is comparable to existing data on these species [27, 34, 35]. Thus, the TLC1 sequences determined here are consistent with the notion that *S. cerevisiae* is about equidistant to *S. bayanus* and *S. pastorianus*. While this work was in progress, whole genome sequences of two distantly related “sensu lato” yeasts became available (*S. kluyveri* and *S. castellii*, [27]). In order to determine the extent of homology between the “sensu stricto” and “sensu lato” telomerase RNA sequences, we searched for homologues in these genomes using conserved sequence elements described above, including the predicted template sequences. We were able to identify a potential sequence for the *S. castellii* TLC1 RNA, but due to the increased primary sequence divergence, a reliable sequence alignment for the complete RNA was not possible (data

not shown). In addition, chromosomal synteny in the region of TLC1 is not maintained between the “sensu stricto” and “sensu lato” species and therefore, a cloning approach using the nearest neighbour was not feasible for the other “sensu lato” species. This suggests that attempts to enhance the confidence of phylogenetic analyses on the predicted secondary structure of the TLC1 RNA for *Saccharomyces* species will require the identification of sequences in new species or in depth biochemical mappings.

The overall predicted structure of the RNA comprises seven major helical domains organized around a central multi-branched loop (Figs. 3 and 4); designated I through VII. Helices I to VI emerge directly from the central loop, while domain VII is linked to domain I by a short single-stranded region. The 5' and 3'-ends of the RNAs are predicted to be in close vicinity, which is typical for non-coding yeast RNAs [36-39]. Helical segments within a domain can be considered very likely to exist if covariation is found for two or more base pairs within the given helix [33, 40]. The covariations supporting the proposed structure are summarized in Table 2. Based on these criteria, the existence of 10 of the predicted 15 helices is well supported by covariation analysis (Table 2). Helix I is unusually long and unlikely to be organized in a linear fashion as drawn out here. Upon inspection of the sequences involved in the formation of this helix, we noticed stretches with highly differing degrees of either primary sequence conservation or occurrence of covariations (Fig. 3). As a first approximation, we divided helix I into 3 segments (Fig. 4): the sequences making up segment A are highly conserved, predicting a conserved function. Segment C is less conserved, but does not include significant instances of covariation. In contrast, segment B is made up of many variable nucleotides and contains 13 covarying bps over the stretch of 43 bps (for *S. cerevisiae*,

Figs. 3, 4). Therefore, the helical nature of segment B is extremely well supported by the covariation analysis. In our model, we retain segments A and B as helices only because we could not obtain evidence supporting an alternative structure. Three of the non-supported helices (stems III, IVb and VI) include sequences that are highly conserved ($\geq 50\%$ complete sequence conservation, see Fig. 3). This very high conservation may suggest a conserved function, but in the absence of covariation, it cannot be distinguished whether the function is supported by the predicted structure, a different structure, or a primary sequence. Other unsupported stems include VIIc and VIId, which reside in close proximity to each other and their structure thus at this point also remained unclear (Figs. 3, 4).

In order to clarify some of these uncertainties and to directly test the capacity of the RNA to fold in vitro, we probed in vitro transcribed TLC1 RNA of *S. cerevisiae* S288C for RNase H accessibility using specific DNA oligonucleotides targeting selected regions on the RNA. The premise of this approach is that single-stranded regions will be accessible to binding by oligonucleotide probes, leading to RNase H-dependent cleavage, while helical regions will not. We first probed two regions of almost certain structure to evaluate the fidelity of the approach and to establish controls for the quality of the RNase H cleavage reaction. The template region was chosen as a positive control for cleavage. This region is likely to be single-stranded as it must be accessible for the association with telomeric DNA, and for other telomerase RNAs, the region was previously shown to be single-stranded in vivo [41]. As negative control, we directed an oligonucleotide to helical region IIa, a short template-proximal stem that is involved in a template boundary function [15]. Thus, while the template region should be accessible

for RNase H cleavage in both folded and denatured RNA, helix IIa should only be accessible when the RNA is kept in denaturing conditions. As expected, the template region of TLC1 RNA was fully accessible to oligonucleotide hybridization and RNaseH cleavage, even after RNA renaturation (oligo RH459, Fig. 4). In contrast, helix IIa was only appreciably cleaved when the RNA was denatured (oligo RH133, Fig. 4). The clean cleavage patterns observed with these limited control sites also suggest that the in vitro RNA folding produces a fairly homogenous RNA structure. Complementary oligonucleotides targeting specific other regions of the RNA were thus used in subsequent RNase H experiments as outlined on the predicted structure in Fig. 4 (cleavage patterns at selected sites are shown in Fig. 4B, and data not shown). The results of the probing experiments were included in the iterative process of phylogenetic analyses and revealed a strong overall congruency between the proposed RNA structure for *S. cerevisiae* and accessibility of the RNA to RNase H-mediated probing (Fig. 4A).

Since the RNaseH accessibility experiments were performed on in vitro transcribed and folded RNA, they do not necessarily provide direct indications for the presence or the absence of a given structure by themselves. However, in the context of the predicted structure that is supported by phylogenetic analyses, such experiments can lend a strong support for the proposed structure. More importantly, a disagreement between the biochemical and phylogenetic data flags problematic regions that need to be analyzed further.

In our prediction of the secondary structure of the *S. cerevisiae* TLC1 RNA, there is an almost perfect correlation between sequences predicted to be in helices by covariation

and relative inaccessibility of such strands to RNase H mapping. Interestingly, all helices which were established by previous genetic experiments are indeed helices by our analyses. Such areas include a conserved bulged stem (IVc), the structure of which has been shown to be important for association of an essential factor for in vivo telomerase activity (Est1p, [14]). Resistance of the conserved stem IIa, a boundary element for telomerase-mediated reverse transcription [15, 42], is discussed above. The analyses here also show covariation and RNase H support for the predicted stem IIc. Previous analyses of this area strongly suggested a helix and this stem was later shown to be important for Ku-protein binding and telomerase recruitment [16, 17].

The predicted terminal loop on stem VIIId is clearly accessible to the mapping while stems VIIb and VIIa adjacent are not (RH1059, RH1009 and RH980, Fig. 4). Thus, while our data do not prove the precise organization of the region around stems VIIb-d, they are consistent with the organization presented.

A special case was found to be present on the terminal loops of stems V and VI (locations RH717, RH740, RH761 and RH765, Fig. 4A). These loops are predicted to be single-stranded but clearly, the left sides of both loops are relatively inaccessible to RNase H probing (Fig. 4B). At least for the loop of stem VI, this inaccessibility is unlikely due to a general occlusion of the site for oligonucleotide or enzyme access, since an oligonucleotide targeting the right side of loop VI directs quite efficient RNase H-mediated cleavage (oligo RH765, Fig. 4B). Upon further inspection of the sequences in these loops, we noted an almost perfect complementarity between sequences overlapping those targeted by RH717 and RH761. In addition, this complementarity is highly conserved in the TLC1 sequences from all species analyzed here (see Figs. 3

and S1). It is therefore tempting to speculate that these loops interact with each other to form a tertiary interaction. Intriguingly, this pseudo-knot structure would lie in an area that was previously shown to interact with the catalytic subunit of the yeast telomerase (Est2p, [13]). A pseudo-knotted structure in the vicinity of the predicted catalytic center comprising the template region is also a conserved element for vertebrate and ciliate telomerase RNAs [22, 25, 43]. Furthermore, a similar pseudo-knot at a presumably analogous position was found to be an essential element for the function of *K. lactis* telomerase RNA [44]. Given that the yeast Est2p protein clearly has recognizable similarities to catalytic subunits of telomerases in other organisms [3], it would make sense that the associated RNAs would also display similarities. Thus, our structure is also consistent with the presence of a tertiary RNA interaction forming a pseudo-knot in the area of TERT/Est2p interaction. In the *Saccharomyces* RNAs, this pseudo-knot could be formed by an interaction of the terminal loops of stems V and VI.

Overall, the predicted structure could be divided into at least three functional regions: (i) the central core which may include the template region and stems III, IVa-c, V and VI. This element would associate with the core proteins for enzymatic activity in vivo (Est2p, Est1p and perhaps others). It would also include a potential pseudo-knot and a template boundary element (proximal part of stem IIa, [15]). A second region (ii) involves stems IIa-d. The distal end of this domain has been shown to be associated with the yeast Ku-proteins and a terminal deletion of that stem IIc is tolerated, but produces short telomeres [17]. Clearly, there is variability around the stems IIb and IIc with some yeast species probably having additional stems (IIb_1 and IIc_1, see insets Fig. 3). The complete area that includes stems IIc, IIc_1 and IIc_2 was deleted from the *S. cerevisiae*

molecule and in a separate experiment, stem IIb was also removed. For both cases, the remaining molecules complemented a TLC1-deletion (data not shown). Thus, as proposed previously, the distal areas of stems IIb-d are non-essential but could function as recruitment domain via the Ku-proteins [16]. The third region (iii)(stems VIIa-c and the single-stranded 3'-end) is separated from area (i) by quite a large domain (stem I), which probably has functional sub-elements. From deletions studies, there is evidence that area (iii) is also non-essential [13]. However, a region in the telomerase RNA of *K. lactis* and which could be analogous to stems VII appears essential for *K. lactis* telomerase function [45]. Finally, the distal most 3'-end region, which includes the Sm-binding site, clearly influences the stability of the RNA [12]. In addition, the existence of RNAs with extensions of up to 80 nt downstream of the major 3'-end near the Sm-site suggests additional, and as yet unknown processing events. It remains to be determined whether the rest of area (iii) also contributes to RNA stability or whether this region is involved in other aspects of RNP function. For example, the mature yeast RNP is thought to function as a dimer [46], but the region(s) on the TLC1 RNA contributing to this multimerization are unknown.

Large structural elements of the yeast telomerase RNA could be non essential [13, 45]. Precedence for an addition of large, yeast-specific and non-essential sequences to otherwise conserved non-coding RNAs is also provided by the spliceosomal U1 and U2 snRNAs [37, 47-49]. Much of the yeast U1 and U2 snRNA sequences are dispensable for function and homologous sequences are absent from the vertebrate snRNAs. However, an important functional domain of the yeast U1 snRNA folds into a structure that is highly similar to that of the vertebrate RNA [47, 49]. Given the detailed structural

organization of the yeast telomerase RNA presented here, it will be interesting to determine whether a much smaller functional RNA with conserved structural domains can be derived.

CONCLUSIONS

We present a detailed working secondary structure model for the large *S. cerevisiae* telomerase RNA. The structure suggests sub-elements with functional similarities to the vertebrate and ciliate RNAs, as well as yeast specific elements. The prediction now allows for a detailed molecular genetic and biochemical analysis of the telomerase RNP in a genetically tractable system.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Yeast species and nucleic acids

The yeast strains used in this work are listed in Supplemental Table S2. Yeast transformations were performed using the LiAc/ssDNA/PEG method as described in [50]. Haploid yeast strains were generated by sporulation in 0.5% KOAc at 26°C, followed by tetrad dissection. For all haploid cell analyses, strains were derived from four tetrads that showed the expected 2:2 segregation patterns. Genomic DNAs for PCR amplification of TLC1 loci from “sensu stricto” species were isolated using a CsCl-method as described previously [51]. Genomic DNA for Southern blot analysis was isolated using a glass bead method [52]. RNA extractions were as described previously [53]. PCR reactions were carried out on a Techgene thermal cycler. Oligonucleotides used in this work are listed in Supplemental Table S3.

PCR amplification, plasmid construction and sequencing

For cloning of the TLC1 loci, initial rounds of PCR amplifications were performed using oligonucleotides designed to align in the vicinity of the TLC1 gene. The *S. cerevisiae* genes PDX3 and CSG2 flank the TLC1 gene and homologues can be found in more distant hemiascomycetous yeasts (Genolevures online Database: <http://cbi.labri.fr/Genolevures/>). Therefore, we reasoned that such genes would be present in all species of the “sensu stricto” complex, which are the yeast species most closely related to *S. cerevisiae*. Moreover, chromosomal synteny between species of this group is very high and we assumed it was maintained around the TLC1 locus. Thus, based on highly conserved sequences of PDX3 and CSG2 genes, forward and reverse

primers were designed. PCR fragments were cloned, sequenced and new primers, now specific for each species, were subsequently designed such as to amplify full-length candidate TLC1 homologues. The primer pairs used in a final round of PCR can be found in the Supplemental Table S3. Each 25- μ l reaction contained 10 mM Tris-Cl, pH 8.8, 25 mM KCl, 5 mM (NH₄)₂SO₄, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM each dNTP, 1.5-2.5 U Pow polymerase (Roche), 20 pmol of each primer and 50 ng of genomic DNA from the appropriate species. Amplification was carried out with 1 cycle at 94°C for 2 min, 35 cycles at 94°C for 15 s, 50°C for 30 sec and 72°C for 2 min, and one final cycle at 72°C for 5 min. Reaction products were digested using unique restriction enzyme sites added to each primer, gel-purified using QIAquick gel extraction kits and cloned into pADCEN26. pADCEN26 is derived from pRS316, into which a 327-bp fragment containing the transcription terminator region of the ADH1 gene was inserted [54, 55]. Candidate telomerase RNA loci from *S. cerevisiae* (BY) and *S. cerevisiae* (SK1), *S. paradoxus*, *S. cariocanus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, *S. bayanus* and *S. pastorianus* were cloned into pADCEN26 to generate plasmids pADCEN36, pADCEN35, pADCEN42, pADCEN43, pADCEN44 pADCEN45, pADCEN46, pADCEN49, respectively. For each locus, both strands of inserts derived from two independent PCR reactions and clones were sequenced. The nucleotide sequence data reported in this article were deposited in GenBank under the accession numbers xxx-xxx for the *S. cerevisiae* (SK1), *S. paradoxus*, *S. cariocanus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, *S. bayanus* and *S. pastorianus* telomerase RNAs, respectively.

Primer extensions

Approximately 2 pmol of radiolabeled oligonucleotide primer complementary to nucleotides 33-49 or 52-68 relative to the previously proposed 5' end of the *S. cerevisiae* TLC1 RNA or to homologous regions of the other *Saccharomyces* RNAs were annealed to 5-15 µg of total yeast RNA at 37°C and extended with avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Roche) at 42°C. Products were analyzed by PAGE. The same primers were used to determine the positions of the primer extension stops by direct comparison with dideoxynucleotide chain termination reactions on the appropriate genomic clone on the same gel. As a positive control for reverse transcriptase activity, an in vitro generated sense RNA starting at position -122 in the *S. cerevisiae* TLC1 locus was used.

Phylogenetic analysis and helix nomenclature

Telomerase RNA sequences were aligned using the computer program ClustalW with manual corrections (MacVector Software, Oxford Molecular). Segments of highly conserved regions were used as anchors for alignment. Putative helices were identified by visual search of covarying paired residues [40, 56, 57]. We considered a single base-pair position as covarying, if: (1) the helix in which the bp resides is provided by complementary sequences present in homologous segments of all molecules inspected; (2) two independent compensatory changes restoring usual pairings (canonical and wobble: G-C, A-U and G · U) occur when at least 6 out of the 8 molecules were used. Multiple covariations at a single base-pair position are only counted as one covariation such that the total number of covariations in a given helix is always \leq helix length in bp. The presence of two or more covariations within a potential helix was accepted as a

strong indication for the existence of that particular helix [40]. The phylogenetic analysis was aided by the use of X2s, an algorithm that identifies compensatory base changes in a set of properly aligned sequences [58], in conjunction with m-Fold, an RNA folding program based on lowest free-energy estimates of helix stability [59, 60]. Data from previously characterized structures were integrated in the initial analysis, allowing optimization of the structure. Where no conserved structure was possible, the RNA was either left single-stranded or is drawn out as proposed by m-Fold. In the proposed structure, 7 helical domains are organized around a central loop and labelled in Roman numerals, I to VII, from 5' to 3'. Helices were numbered from 5' to 3' in order of their occurrence and the numbering was increased by one upon each passage of a multibranched loop, a pseudo-knot loop or a single-stranded region that does not form a loop. Helical segments separated only by internal loops (bulges) are considered to belong to the same helix [61]. In the case of helices not belonging to the core structure, but specific to certain species (Fig. 3), an underscore and a number are appended to the number of the preceding helix [62].

RNA transcription, site-specific oligonucleotide/RNase H cleavage and capillary electrophoresis on a chip.

The DNA fragments for in vitro transcription of TLC1 RNA were obtained by PCR amplification of plasmid pADCEN36 using oligonucleotides TLC1T7F and TLC1R (Supplemental Table S3). The fragment of the expected size was gel-purified and then used to generate TLC1 RNA with the T7 MEGAscript transcription kit (Ambion).

The TLC1 RNA transcript was phenol/chloroform extracted, isopropanol precipitated and resuspended in water at a final concentration of 6 pmol/ μ l (\sim 2 μ g/ μ l).

RNAse H cleavage was performed using DNA oligonucleotides complementary to indicated regions of the *S. cerevisiae* TLC1 RNA (Fig. 4; Supplemental Table S2). The TLC1 RNA substrate was heated to 90°C for 1 min. and 1.25 μ l (1.4 pmol, \sim 500 ng) of denatured RNA was added to 1.25 μ l of cold folding buffer (100 mM Tris-Cl, pH 8.0, 20 mM MgCl₂, 20 mM NaCl, 2 mM DTT). The reaction mixture was incubated for 2 min on ice and for 30 min at 30°C. 2.5 μ l of prewarmed RNAse H buffer (50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, 1 mM DTT, 1.4 pmol of oligo probe and 1.25U of RNAse H (USB) was added and the reaction mix incubated for 10 min at 30°C. Cleavage reactions were terminated by freezing in dry ice followed by heating to 90°C for 1 min. Three control reactions were routinely performed for all series of experiments: a) omitting a DNA oligonucleotide from the reaction; b) using a DNA oligonucleotide targeting a well characterized helical region (reduced accessibility; for example proximal portion of stem IIa, see text); c) using a DNA oligonucleotide targeting the single-stranded template region (full accessibility).

RNAse H treated TLC1 RNA was directly analyzed on a RNA 6000 Nano LabChip kit (Agilent Technologies). Chips and samples were prepared according to the manufacturer's instructions. Briefly, the gel matrix was prepared by adding 1 μ l of provided dye to 65 μ l of gel and the gel/dye mixture was filtered. 9 μ l of gel/dye mixture were successively loaded into the priming well and into the buffer wells. 5 μ l of RNA 6000 Nano marker were loaded in sample and ladder wells followed by addition of 1 μ l of denatured ladder and 1 μ l of the cleavage reaction mix (0.25 pmol \approx 100 ng RNA). The

chip was vortexed and placed in the Agilent 2100 Bioanalyzer for capillary electrophoresis. Quantitative RNA detection by laser induced fluorescence is usually documented by an electrophoregram, which then is converted and displayed as a gel-like image.

Senescence assays and telomere length analysis

Diploid strain CSHY76, in which one copy of the TLC1 and RAD52 genes were replaced by LEU2 and TRP1 genes respectively [63], was transformed with plasmids containing candidate TLC1 homologues (pADCEN36, pADCEN35, pADCEN42, pADCEN43, pADCEN44 pADCEN45, pADCEN46, pADCEN49) or an empty plasmid (pADCEN26). After sporulation and tetrad dissection, single spores carrying a homologue-containing plasmid were restreaked on medium lacking uracil to assay for rescue of senescence. Single colonies from non-senescent strains were picked after 100 generations and streaked on 5-FOA (5-Fluoro-oroic acid) medium to select for cells that had lost the complementing plasmid [64]. Such cells were then successively restreaked onto complete media to assay for senescence and confirm plasmid dependent survival. In parallel, single colonies transformed with candidate telomerase RNA genes were picked 20, 40, 60, 80 and 100 generations after sporulation and grown for ~10 generations in 5 ml of medium lacking uracil. Cells were harvested, genomic DNA isolated and digested with XhoI. 1 µg of the XhoI-digested DNA was separated on a 1% agarose gel and transferred to nylon membrane (Amersham Hybond-N+) by capillarity. The appropriate bands were visualized by hybridization at 55°C with a random primed telomeric probe.

Northern blot analysis

15 µg of RNA derived from appropriate cultures were separated on a 4% acrylamide/8M urea gel and electroblotted to a nylon membrane (Amersham Hybond-N+). Blots were UV irradiated, stained with methylene blue to locate 18 and 25S rRNAs [65], and then probed with random prime labelled fragments that specifically detect the appropriate TLC1 homologue.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank C. Greider and D. Gottschling for strains; particularly E. Louis and J. Piskur for providing “sensu stricto” as well as “sensu lato” strains and useful discussions. S. Metaoui and F. Madore provided expert informatics support. We also thank D. Zappulla and V. Lundblad for discussing results prior to publication. This work was supported by grants of the Canadian Cancer Society (NCIC; 013235) to RJW, of the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; MOP67162) to SAE, and a core group grant of the CIHR (GRP86284). RJW is a Chercheur-National and SAE a Chercheur-Boursier of the Fonds de Recherche en Santé du Quebec (FRSQ).

REFERENCES

1. Chan, S.W., and Blackburn, E.H. (2002). New ways not to make ends meet: telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin. *Oncogene* 21, 553-563.
2. de Lange, T. (2002). Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* 21, 532-540.
3. Lingner, J., Hughes, T.R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V., and Cech, T.R. (1997). Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* 276, 561-567.
4. Kelleher, C., Teixeira, M.T., Forstemann, K., and Lingner, J. (2002). Telomerase: biochemical considerations for enzyme and substrate. *Trends Biochem Sci* 27, 572-579.
5. Singer, M.S., and Gottschling, D.E. (1994). TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science* 266, 404-409.
6. Chen, J.L., and Greider, C.W. (2004). Telomerase RNA structure and function: implications for dyskeratosis congenita. *Trends Biochem Sci* 29, 183-192.
7. Shippen-Lentz, D., and Blackburn, E.H. (1990). Functional evidence for an RNA template in telomerase. *Science* 247, 546-552.
8. Taggart, A.K., and Zakian, V.A. (2003). Telomerase: what are the Est proteins doing? *Current Opinion in Cell Biology* 15, 275-280.
9. Lundblad, V. (2003). Telomere replication: an est fest. *Curr Biol* 13, R439-441.
10. Mason, P.J., and Marrone, A. (2003). Dyskeratosis congenita. *Archives of Biochemistry & Biophysics* 415, 229-234.
11. Chapon, C., Cech, T.R., and Zaug, A.J. (1997). Polyadenylation of telomerase RNA in budding yeast. *Rna* 3, 1337-1351.
12. Seto, A.G., Zaug, A.J., Sobel, S.G., Wolin, S.L., and Cech, T.R. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* telomerase is an Sm small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nature* 401, 177-180.
13. Livengood, A.J., Zaug, A.J., and Cech, T.R. (2002). Essential regions of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase RNA: separate elements for Est1p and Est2p interaction. *Mol Cell Biol* 22, 2366-2374.
14. Seto, A.G., Livengood, A.J., Tzfati, Y., Blackburn, E.H., and Cech, T.R. (2002). A bulged stem tethers Est1p to telomerase RNA in budding yeast. *Genes Dev* 16, 2800-2812.
15. Seto, A.G., Umansky, K., Tzfati, Y., Zaug, A.J., Blackburn, E.H., and Cech, T.R. (2003). A template-proximal RNA paired element contributes to *Saccharomyces cerevisiae* telomerase activity. *Rna* 9, 1323-1332.
16. Stellwagen, A.E., Haimberger, Z.W., Veatch, J.R., and Gottschling, D.E. (2003). Ku interacts with telomerase RNA to promote telomere addition at native and broken chromosome ends. *Genes Dev* 17, 2384-2395.
17. Peterson, S.E., Stellwagen, A.E., Diede, S.J., Singer, M.S., Haimberger, Z.W., Johnson, C.O., Tzoneva, M., and Gottschling, D.E. (2001). The function of a stem-loop in telomerase RNA is linked to the DNA repair protein Ku. *Nat Genet* 27, 64-67.
18. Noller, H., and Woese, C. (1981). Secondary structure of 16S ribosomal RNA. *Science* 212, 403-411.

19. Williams, K.P., and Bartel, D.P. (1996). Phylogenetic analysis of tmRNA secondary structure. *Rna* 2, 1306-1310.
20. James, B.D., Olsen, G.J., Liu, J.S., and Pace, N.R. (1988). The secondary structure of ribonuclease P RNA, the catalytic element of a ribonucleoprotein enzyme. *Cell* 52, 19-26.
21. Fox, G., and Woese, C. (1975). 5S RNA secondary structure. *Nature* 256, 505-507.
22. Chen, J.L., Blasco, M.A., and Greider, C.W. (2000). Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell* 100, 503-514.
23. Romero, D.P., and Blackburn, E.H. (1991). A conserved secondary structure for telomerase RNA. *Cell* 67, 343-353.
24. Lingner, J., Hendrick, L.L., and Cech, T.R. (1994). Telomerase RNAs of different ciliates have a common secondary structure and a permuted template. *Genes Dev* 8, 1984-1998.
25. ten Dam, E., van Belkum, A., and Pleij, K. (1991). A conserved pseudoknot in telomerase RNA. *Nucleic Acids Res* 19, 6951.
26. Barnett, J. (1992). The taxonomy of the genus *Saccharomyces* Meyen ex Reess: A short review for non-taxonomists. *Yeast* 8, 1-23.
27. Cliften, P.F., Hillier, L.W., Fulton, L., Graves, T., Miner, T., Gish, W.R., Waterston, R.H., and Johnston, M. (2001). Surveying *Saccharomyces* genomes to identify functional elements by comparative DNA sequence analysis. *Genome Res* 11, 1175-1186.
28. Naumova, E.S., Bulat, S.A., Mironenko, N.V., and Naumov, G.I. (2003). Differentiation of six sibling species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex by multilocus enzyme electrophoresis and UP-PCR analysis. *Antonie van Leeuwenhoek* 83, 155-166.
29. Masneuf, I., Hansen, J., Groth, C., Piskur, J., and Dubourdieu, D. (1998). New hybrids between *Saccharomyces sensu stricto* yeast species found among wine and cider production strains. *Applied & Environmental Microbiology* 64, 3887-3892.
30. Lundblad, V., and Blackburn, E.H. (1993). An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence. *Cell* 73, 347-360.
31. Bosoy, D., Peng, Y., Mian, I.S., and Lue, N.F. (2003). Conserved N-terminal motifs of telomerase reverse transcriptase required for ribonucleoprotein assembly in vivo. *J Biol Chem* 278, 3882-3890.
32. Jones, M.H., and Guthrie, C. (1990). Unexpected flexibility in an evolutionarily conserved protein-RNA interaction: genetic analysis of the Sm binding site. *Embo J* 9, 2555-2561.
33. James, B.D., Olsen, G.J., and Pace, N.R. (1989). Phylogenetic comparative analysis of RNA secondary structure. *Methods Enzymol* 180, 227-239.
34. Keogh, R.S., Seoighe, C., and Wolfe, K.H. (1998). Evolution of gene order and chromosome number in *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and related fungi. *Yeast* 14, 443-457.
35. Montrocher, R., Verner, M.C., Briolay, J., Gautier, C., and Marmeisse, R. (1998). Phylogenetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* group based on polymorphisms of rDNA spacer sequences. *Int J Syst Bacteriol* 48 Pt 1, 295-303.

36. Ares, M., Jr., and Igel, A.H. (1990). Lethal and temperature-sensitive mutations and their suppressors identify an essential structural element in U2 small nuclear RNA. *Genes Dev* 4, 2132-2145.
37. Shuster, E.O., and Guthrie, C. (1988). Two conserved domains of yeast U2 snRNA are separated by 945 nonessential nucleotides. *Cell* 55, 41-48.
38. Balakin, A.G., Lempicki, R.A., Huang, G.M., and Fournier, M.J. (1994). *Saccharomyces cerevisiae* U14 small nuclear RNA has little secondary structure and appears to be produced by post-transcriptional processing. *J Biol Chem* 269, 739-746.
39. Yeh, L.C., and Lee, J.C. (1992). Structure analysis of the 5' external transcribed spacer of the precursor ribosomal RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 228, 827-839.
40. Pace, N.R., Smith, D.K., Olsen, G.J., and James, B.D. (1989). Phylogenetic comparative analysis and the secondary structure of ribonuclease P RNA--a review. *Gene* 82, 65-75.
41. Zaug, A.J., and Cech, T.R. (1995). Analysis of the structure of *Tetrahymena* nuclear RNAs in vivo: telomerase RNA, the self-splicing rRNA intron, and U2 snRNA. *Rna* 1, 363-374.
42. Tzfati, Y., Fulton, T.B., Roy, J., and Blackburn, E.H. (2000). Template boundary in a yeast telomerase specified by RNA structure. *Science* 288, 863-867.
43. Collins, K. (1999). Ciliate telomerase biochemistry. *Annu Rev Biochem* 68, 187-218.
44. Tzfati, Y., Knight, Z., Roy, J., and Blackburn, E.H. (2003). A novel pseudoknot element is essential for the action of a yeast telomerase. *Genes Dev* 17, 1779-1788.
45. Roy, J., Fulton, T.B., and Blackburn, E.H. (1998). Specific telomerase RNA residues distant from the template are essential for telomerase function. *Genes Dev* 12, 3286-3300.
46. Prescott, J., and Blackburn, E.H. (1997). Functionally interacting telomerase RNAs in the yeast telomerase complex. *Genes Dev* 11, 2790-2800.
47. Kretzner, L., Krol, A., and Rosbash, M. (1990). *Saccharomyces cerevisiae* U1 small nuclear RNA secondary structure contains both universal and yeast-specific domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 851-855.
48. Igel, A.H., and Ares, M., Jr. (1988). Internal sequences that distinguish yeast from metazoan U2 snRNA are unnecessary for pre-mRNA splicing. *Nature* 334, 450-453.
49. Collins, C.A., and Guthrie, C. (2000). The question remains: is the spliceosome a ribozyme? *Nat Struct Biol* 7, 850-854.
50. Gietz, R.D., and Woods, R.A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in Enzymology* 350, 87-96.
51. Rose, M.D., Winston, F., and Hieter, P. (1990). Preparation of yeast genomic DNA (CsCl method). In *Methods in yeast genetics: A laboratory course manual*. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 133-135.

52. Dionne, I., and Wellinger, R.J. (1996). Cell cycle-regulated generation of single-stranded G-rich DNA in the absence of telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13902-13907.
53. Rose, M.D., Winston, F., and Hieter, P. (1990). Yeast RNA isolation. In *Methods in yeast genetics: A laboratory course manual*. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 140-142.
54. Sikorski, R.S., and Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.
55. Ammerer, G. (1983). Expression of genes in yeast using the ADH1 promoter. *Methods Enzymol* 101, 192-201.
56. Woese, C.R., Gutell, R., Gupta, R., and Noller, H.F. (1983). Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids. *Microbiological Reviews* 47, 621-669.
57. Gutell, R.R., Larsen, N., and Woese, C.R. (1994). Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiological Reviews* 58, 10-26.
58. Juan, V., and Wilson, C. (1999). RNA secondary structure prediction based on free energy and phylogenetic analysis. *Journal of Molecular Biology* 289, 935-947.
59. Mathews, D.H., Sabina, J., Zuker, M., and Turner, D.H. (1999). Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *Journal of Molecular Biology* 288, 911-940.
60. Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* 31, 3406-3415.
61. Wuyts, J., Van de Peer, Y., and De Wachter, R. (2001). Distribution of substitution rates and location of insertion sites in the tertiary structure of ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research* 29, 5017-5028.
62. De Rijk, P., Caers, A., Van de Peer, Y., and De Wachter, R. (1998). Database on the structure of large ribosomal subunit RNA. *Nucleic Acids Research* 26, 183-186.
63. Le, S., Moore, J.K., Haber, J.E., and Greider, C.W. (1999). RAD50 and RAD51 define two pathways that collaborate to maintain telomeres in the absence of telomerase. *Genetics* 152, 143-152.
64. Boeke, J.D., Trueheart, J., Natsoulis, G., and Fink, G.R. (1987). 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods in Enzymology* 154, 164-175.
65. Good, L., Elela, S.A., and Nazar, R.N. (1994). Tetrahymena ribozyme disrupts rRNA processing in yeast. *Journal of Biological Chemistry* 269, 22169-22172.

FIGURE LEGENDS.

Figure 1: Size estimation of TLC1 RNA homologues.

Total RNA isolated from *S. cerevisiae* S288C (Scec), *S. cerevisiae* SK1 (Scek), *S. paradoxus* (Spar), *S. cariocanus* (Scar), *S. mikatae* (Smik), *S. kudriavzevii* (Skud) and *S. bayanus* (Sbay) was subjected to Northern blot analysis using species-specific probes. TLC1 RNA species in *S. cerevisiae* S288C and a size marker (M) position are indicated.

Figure 2: The major 5'-end of the TLC1 RNA in *S. cerevisiae*.

Oligonucleotide PXCER23 complementary to nucleotides 23 to 39 was used for primer extension analysis of telomerase RNA of *S. cerevisiae* S288C strains containing a wild-type TLC1 gene (lane 4), or harbouring a deletion of the TLC1 gene (lane 3). For the sequencing reactions, the cloned TLC1 gene was used as template. Solid arrow denotes the major 5' end. Open arrows denote TLC1 RNA species with additional 5'-extensions. Reactions were also performed without RNA (lane 1) or in presence of an in vitro generated TLC1 transcript starting 122 nucleotides upstream the major in vivo 5' end (lane 2).

Figure 3: Minimum consensus structure of telomerase RNA in species of the *Saccharomyces* "sensu stricto" complex.

The conserved core incorporates only consensus nucleotides that were identifiable in all the molecules inspected. Symbols used are defined in the key in the lower left. The template region and the Sm-motif are labelled and their consensus nucleotides are bracketed. Simplified drawings corresponding to structures for *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* and *S. bayanus* indicating certain species-specific differences are outlined in the lower right. Letters A, B, C on stem I indicate a possible sub-division of stem I (see text).

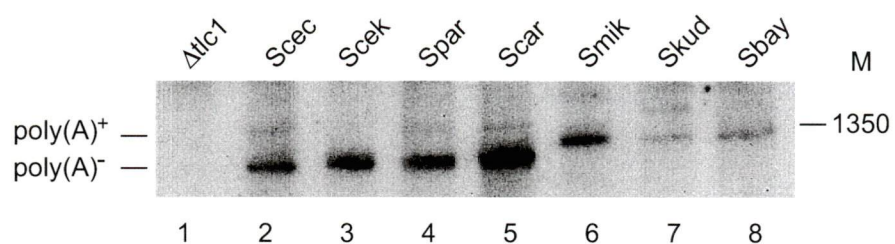
Figure 4: Secondary structure model of telomerase RNA of *S. cerevisiae* based on phylogenetic comparison and RNase H probing.

(A) The secondary structure model was established by comparative phylogenetic analyses in conjunction with RNase H probing data. Symbols used are defined in the key in the lower left. Helical domains are numbered from 5' to 3' in their order of occurrence as I to VII. The template region and the Sm motif are labelled and the consensus nucleotides are bracketed. Positions are referred to by nucleotide positions,

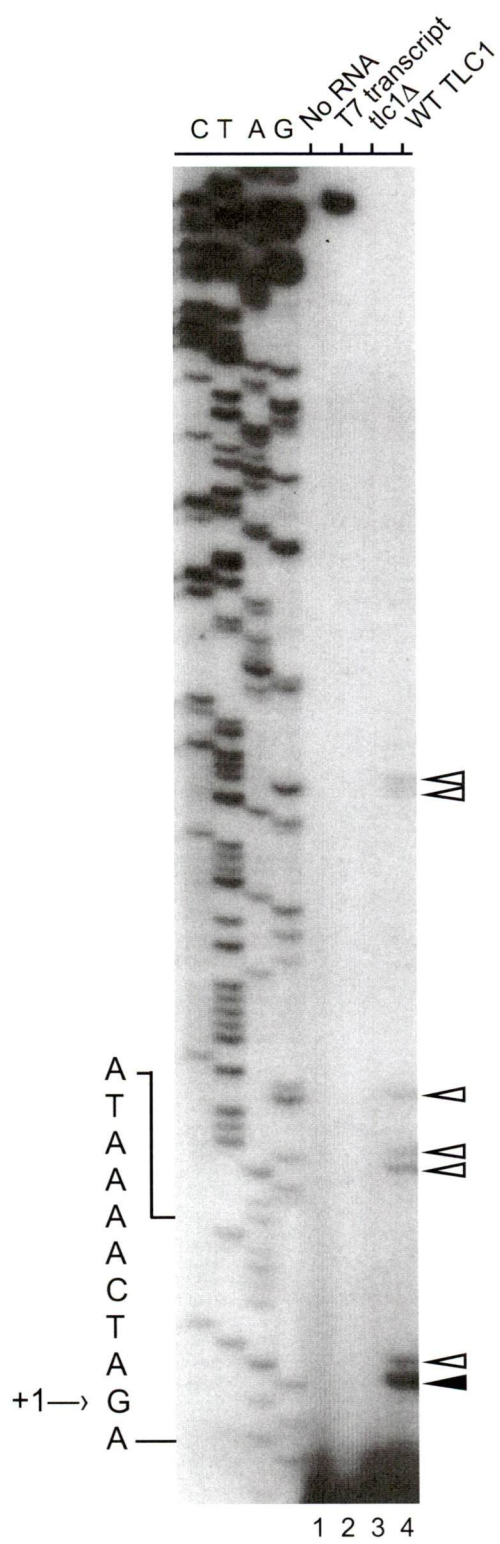
using +1 as defined in Figure 1. Sites targeted by complementary DNA oligonucleotides in RNase H experiments are indicated with an arrow.

(B) In vitro susceptibility of TLC1 RNA to oligonucleotide/RNase H cleavage. The synthetic TLC1 RNA transcript was submitted to RNase H treatment in denaturing conditions (D) or after renaturation (R) and the cleavage products were fractionated on a RNA 6000 Nano LabChip. Typical examples of TLC1 RNA probings are shown in the gel-like image. The input (lane 1) represents 1.4 pmole of TLC1 RNA mock-treated in the absence of any oligonucleotide. Probe RH459 (lanes 2 and 3), which is complementary to the single-stranded template region is used as positive control (>60% cleavage in renatured conditions). Probe RH133 (lanes 4 and 5) which targets the template boundary element, a previously characterized helical structure, is used as negative control (<10% cleavage in renatured conditions). RH717 (lane 6) and RH761 (lane 8) are directed to interacting loops of the putative pseudo-knot I and produce little to moderate cleavage. Probe RH740 (lane 7) does not cleave the predicted, but not phylogenetically supported stem of helix VI. RNA size markers (M) are indicated on the left. Close triangle: unreacted input RNA (~1159 nt). Open triangle: RNA loading control. Note that lane 4 is slightly overexposed. For precise positions of all oligonucleotides used in the RNase H experiments, see Supplemental Table S3.

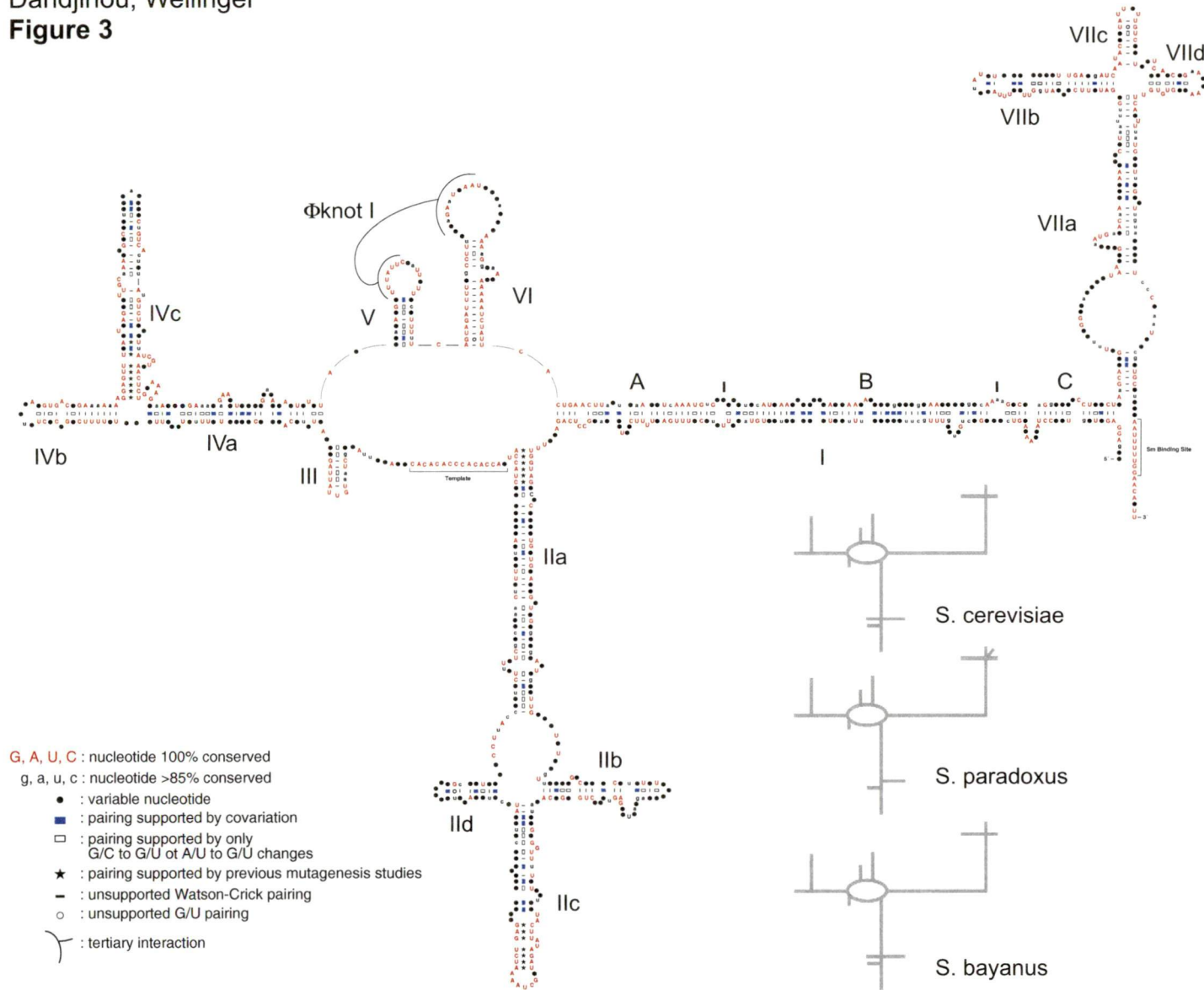
Dandjinou, Wellinger
Figure 1



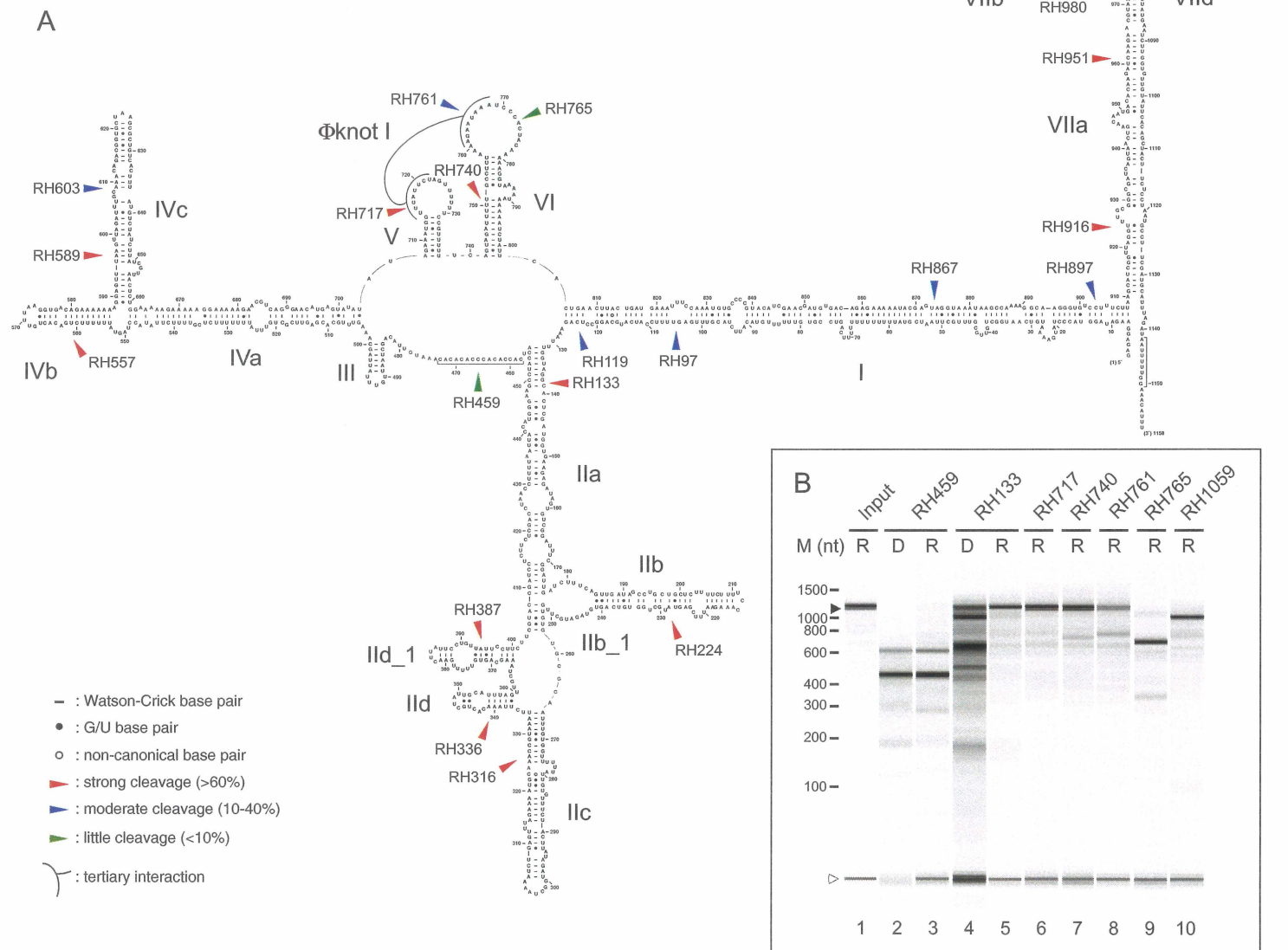
Dandjinou, Wellinger
Figure 2



Dandjinou, Wellinger
Figure 3



Dandjinou, Wellinger
Figure 4



TABLES

Table 1. Complementation of a TLC1 disruption in *S. cerevisiae* S288C by TLC1 loci from the "sensu stricto" species.

Gen. of growth	Cells grown on:							
	YC-TRP-LEU-URA					FOA	YC-TRP-LEU	
	20G	40G	60G	80G	100G	120G 20G ^a	140G 40G ^a	160G 60G ^a
<i>S. cer.</i> S288C pADCEN36	++	++	++	++	++	+/-	+/-	-
<i>S. cer.</i> SK1 pADCEN35	++	++	++	++	++	+/-	+/-	-
<i>S. paradoxus</i> pADCEN42	++	++	++	++	++	+/-	+/-	-
<i>S. cariocanus</i> pADCEN43	++	++	++	++	++	+	+/-	-
<i>S. mikatae</i> pADCEN44	++	++	++	++	++	+	+/-	-
<i>S. kudriavzevii</i> pADCEN45	++	++	++	++	++	+/-	+/-	-
<i>S. bayanus</i> pADCEN46	++	+	+/-	-	⚡			
<i>S. pastorianus</i> pADCEN49	++	++	++	++	++	+/-	-	
None pADCEN26	+	+/-	-					

S. cerevisiae strains (CSHY76) lacking the TLC1 and RAD52 genes and bearing the indicated plasmids (left most column) were grown for 100 generations on YC-TRP-LEU-URA medium to determine the ability of the TLC1 homologue-containing vector to complement senescence. Two independent transformants were selected for each TLC1 homologue. Subsequent growth on 5-FOA medium and on TC-LEU-TRP medium established plasmid-dependence for survival. Plasmid pADCEN36 is used as positive control. Empty plasmid pADCEN26 is used as negative control. Viability is scored based on colony size after 3 days; ++: growth rate similar to that of the positive control; - : absence of growth; +/- : intermediate growth. a: Generations after loss of plasmid.

Table 2. Base pairings in the TLC1 RNA secondary structure model.

Paired Regions			No of base pair positions displaying covariation ^c	No of base pair positions 100% Conserved	Number of base pair positions with G/C to G/U or A/U to G/U changes ^c
Helix Number ^a	Nucleotide Positions ^b	Length (bp)			
I	8-127/806-910	100	16 (16%)	19 (19%)	16 (16%)
IIa	133-177/410-457	45	5 (11%)	10 (22%)	11 (24%)
IIb	179-211/215-249	31	3 (10%)	2 (6%)	4 (25%)
IIb_1 ^d	253-261/402-409	8	0	2 (25%)	0
IIc	264-298/306-335	28	6 (21%)	8 (28%)	5 (18%)
IId	338-347/352-360	9	3 (33%)	0	1 (11%)
IId_1 ^e	367-382/387-401	15	0	0	0
III	484-490/496-502	7	0	4 (57%)	4 (57%)
IVa	505-549/662-705	44	7 (16%)	3 (7%)	8 (18%)
IVb	555-568/575-588	14	0	7 (50%)	3 (21%)
IVc	590-622/626-661	31	6 (19%)	13 (42%)	5 (16%)
V	708-715/732-739	8	2 (25%)	1 (13%)	5 (60%)
VI	742-760/779-803	17	0	13 (76%)	1 (6%)
VIIa	911-977/1078-1136	56	5 (9%)	7 (13%)	5 (9%)
VIIb	978-1001/1006-1028	23	4 (17%)	6 (26%)	3 (13%)
VIIc	1029-1037/1042-1050	9	0	3 (33%)	1 (11%)
VIIId	1057-1063/1070-1076	7	0	2 (29%)	4 (57%)
Fknot II	716-723/762-769	8	0	5 (62%)	2 (25%)

^aHelix numbers are from Fig. 3 and Fig. S1. ^bPositions are referred to by nucleotide positions referring to the +1 as defined in Fig. 2. For details of covariation determination see Material and Methods. ^dThis helix is not present in *S. pastorianus*. ^eThis helix is not present in *S. paradoxus* and *S. cariocanus*.

Supplemental Material for Dandjinou et al.: A secondary structure for the yeast telomerase RNA.

Supplemental Figure Legend:

Supplemental Figure S1: Sequence alignment and consensus of telomerase RNA sequences of the *Saccharomyces* “sensu stricto” complex.

The sequences of telomerase RNAs from *S. cerevisiae* S288C (Scec), *S. cerevisiae* SK1 (Scek), *S. paradoxus* (Spar), *S. cariocanus* (Scar), *S. mikatae* (Smik), *S. kudriavzevii* (Skud), *S. bayanus* (Sbay) and *S. pastorianus* (Spas) were aligned as described in the text. Dashes (-) denote gaps introduced within the alignment. The major transcription initiation site determined in Scec is indicated by “+1”. The numbering, marked with dots every tenth nucleotide above the alignment, is according to telomerase RNA sequence from Scec. The RNAs terminates ~10 nucleotides downstream of the Sm site and the total number of nucleotides for the individual RNAs is indicated at the end of the respective sequence. Invariant residues in all species are shown in the consensus lines. Bellow the alignment, nucleotides determining complementary strands of proposed helices are delineated with brackets enclosing helix identification as well as forward or backward arrowheads denoting 5' or 3' strands respectively. The consensus sequences of the template region and the Sm motif are underlined and labelled.

Supplemental Tables:

Supplemental Table S1. Pair wise comparisons of the telomerase RNA sequences derived from *Saccharomyces* "sensu stricto" species.

	S288C	SK1	S. para.	S. cari.	S. mika.	S. kudr.	S. bay.	S. past.
S288C	-	0.977	0.783	0.777	0.702	0.656	0.590	0.589
SK1	18	-	0.78	0.772	0.699	0.649	0.589	0.586
S. para	187	187	-	0.945	0.748	0.682	0.628	0.586
S. cari.	192	195	59	-	0.747	0.682	0.629	0.618
S. mika.	276	280	236	239	-	0.703	0.632	0.618
S. kudr.	321	326	301	303	312	-	0.653	0.644
S. bay.	367	365	336	336	354	333	-	0.895
S. past.	351	355	328	333	353	326	106	-

The upper right half of the table indicates homology values for pair wise comparisons. $H \text{ value} = \text{matches}/(\text{matches} + \text{mismatches} + \text{gaps}/2)$ [1]. Matches, mismatches and gaps are based on the primary sequence alignment of all telomerase RNA sequences in Supplemental Fig. S1. The lower left half of the table indicates absolute numbers of mismatches (nucleotide distances).

Supplemental Table S2. Yeast strains used in this study

Species	Designation	Relevant Genotype	Source
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CSHY76	Mat a/ α ade2/ade2 ura3/ura3 leu2/leu2 his3/his3 trp1/trp1 tlc1::LEU2/TLC1 rad52::TRP1/RAD52	C. Greider (Baltimore, USA) [2]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288C	Mat a/ α	D. Gottschling, Seattle, USA) [3]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SK1	Mat a/ α	E. Louis (Leicester, UK) [4, 5]
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	CBS 432	Mat a/ α	E. Louis (Leicester, UK) [4, 5]
<i>Saccharomyces cariocanus</i>	UFRJ 50791	Mat a/ α	E. Louis (Leicester, UK) [4, 5]
<i>Saccharomyces mikatae</i>	IFO 1815	Mat a/ α	E. Louis (Leicester, UK) [4, 5]
<i>Saccharomyces kudriavzevii</i>	IFO 1802	Mat a/ α	E. Louis (Leicester, UK) [4, 5]
<i>Saccharomyces bayanus</i>	CBS 7001	Mat a/ α	E. Louis (Leicester, UK) [4, 5]
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	DBVPG 6560	Mat a/ α	E. Louis (Leicester, UK) [4, 5]

Table S3. Synthetic oligonucleotides used in this study.

Name	Sequence (5'→3')
CERPDX3 ^a	GGGTACA <u>CTAGT</u> AGCCTTTCTAGAGGTTCC (SpeI)
CERCSG2 ^a	AACAGAATTCGGGAAGGTAAATACCACC (EcoRI)
PARPDX3 ^a	CGC <u>GGATCC</u> CTCCTCAGCTTGTTTAGTCATTG (BamHI)
PARCSG2 ^a	TGC <u>GTCGAC</u> CTCGGGGAAGGTAAATCCCAC (Sall)
CARCSG2 ^a	TGC <u>GTCGAC</u> CTCGGAGAAGGTAAATACCAC (Sall)
MIKPDX3 ^a	CGC <u>GGATCC</u> CTCTTCGGCTTGTTTAGTCATTG (BamHI)
MIKCSG2 ^a	TGC <u>GTCGAC</u> CTCGGTGAAGGCAAATATCAC (Sall)
KUDPDX3 ^a	CGC <u>GGATCC</u> CTCTTGATTGCTTAGTCATTG (BamHI)
BAYCSG2 ^a	TGC <u>GTCGAC</u> CTAGGTGAAGGTAAATACCATC (Sall)
BAYPDX3 ^a	CGC <u>GGATCC</u> CTCCTCGGATTGCTTAGTCATTG (BamHI)
PASPDX3 ^a	ATCCTGATCACTCCTCGGATTGCTTAGTCATTG (BclII)
ADH1TERMF ^a	CCGGAATTCGAGCTCAAGCTTTGGACTTCTTCGCC (SacI)
ADH1TERMR ^a	ATCCGCGGACTAGTGGCCGGTAGAGGTGTGG (SpeI)
PXCER23 ^b	CAGCCATTGACATTTTC
PXCER39 ^b	CGATTAAGCAAACGCAAC
PXPAR39 ^b	CAACTAAGCAAACGCAAC
PXCAR39 ^b	CAACTAAGCAAACGCGAC
PXMIK40 ^b	GCTAGAAAGCAAATGTAAC
PXKUD39 ^b	CTAGTAACTAAACGTGAC
PXBAY39 ^b	GGGCGGGCAAACATACC
TLC1T7F ^c	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGAGAGGAAGATAGGTACC</u>
TLC1R ^c	AAATGTTTCCAAAAATTATCTAAATGC
RH97 ^d	GATGGAAACTCAAACG (helix I)
RH119 ^d	CCAAATTTCTGAGGCC (helix I)
RH133 ^d	CCATCGAGTGCCTACC (helix IIa)
RH224 ^d	CTGACACCAGCATACTC (helix IIb)
RH316 ^d	TTACGGTTTGCATTTTC (helix IIc)
RH336 ^d	TAGCAGTGTTTAAG (helix IId)
RH387 ^d	GAAGGAATAACAGGA (helix IId_1)

RH459 ^d	GTGTGTGGGTGTGGT (template)
RH557 ^d	CAGTGTCAGAAA (helix IVb)
RH589 ^d	TCTAACTTAACTCC (helix IVc)
RH603 ^d	TCTGTTTGCAAAT (helix IVc)
RH717 ^d	ACTAGAATA (helix V)
RH740 ^d	GGCAAAAATCTACTG (helix VI)
RH761 ^d	GTGGGATTTATTCT (helix VI)
RH765 ^d	TTGTAGTGGGATT (helix VI)
RH867 ^d	ACCTACTCGTA (helix I)
RH897 ^d	TGCTTAAGAAAGGACACC (helix I)
RH916 ^d	CGCAAACCTAACCG (helix VIIa)
RH951 ^d	CGTTCTTGATCTTGTGTC (helix VIIa)
RH980 ^d	AAAACCATCTTGAAAA (helix VIIb)
RH1009 ^d	TGATCATCAAAGTAGTTTTA (helix VIIb)
RH1059 ^d	CGGTTCCCTCCGC (helix VIId)

^a PCR primer oligonucleotides. Underlined sequences are restriction sites which were added for subcloning. The corresponding restriction enzyme is indicated in parenthesis. ^b Primer-extension oligonucleotides. ^c Oligonucleotides used for PCR product generation, which served as template for RNA transcription in vitro. T7 RNA polymerase promoter is underlined. Base in bold is the first nucleotide incorporated into RNA during transcription. ^d RNase H oligonucleotide probes. Numbers indicate the positions of the first base on TLC1 RNA according to the numbering system defined in Figure 2 and S1. The targeted structure is indicated in parenthesis. Oligonucleotides for RNase H probing were HPLC- or gel-purified.

REFERENCES for Supplemental Material:

1. Sogin, M.L., Ingold, A., Karlok, M., Nielsen, H., and Engberg, J. (1986). Phylogenetic evidence for the acquisition of ribosomal RNA introns subsequent to the divergence of some of the major Tetrahymena groups. *Embo J* 5, 3625-3630.
2. Le, S., Moore, J.K., Haber, J.E., and Greider, C.W. (1999). RAD50 and RAD51 define two pathways that collaborate to maintain telomeres in the absence of telomerase. *Genetics* 152, 143-152.
3. Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., and Boeke, J.D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14, 115-132.
4. Naumov, G.I., James, S.A., Naumova, E.S., Louis, E.J., and Roberts, I.N. (2000). Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae* [In Process Citation]. *Int J Syst Evol Microbiol* 50, 1931-1942.
5. Fischer, G., James, S.A., Roberts, I.N., Oliver, S.G., and Louis, E.J. (2000). Chromosomal evolution in *Saccharomyces*. *Nature* 405, 451-454.

RÉSULTATS ADDITIONNELS

Sélection des souches de levure apparentées à *S. cerevisiae* pour l'analyse phylogénétique. L'utilisation de l'approche phylogénétique requière que les molécules à comparer proviennent d'organismes suffisamment apparentés pour que les nucléotides homologues soient superposables. Cependant, ces molécules doivent présenter une divergence évolutionniste assez importante pour qu'un nombre satisfaisant de cas de covariation puissent être recensés. Généralement, une divergence de 80 à 50% des gènes encodant les ADN ribosomiaux (18S, 26S, ITS) est considérée comme idéale pour la comparaison phylogénétique (James et al., 1989). *Saccharomyces cerevisiae* fait partie du complexe « Sensu stricto » comprenant *S. paradoxus*, *S. cariocanus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, *S. bayanus*, et *S. pastorianus*. Ce groupe est phylogénétiquement distinct du groupe des « Sensu lato » (Figure 17; Kurtzman et Robnett, 2003).

Analyse des séquences télomériques des espèces du groupe *Saccharomyces* « Sensu stricto ». Afin d'étudier la variabilité des séquences télomériques dans le groupe des « Sensu stricto », nous avons analysé l'ADN génomique de chacune des espèces par Southern. Chez *S. cerevisiae*, les séquences sous-télomériques Y' contiennent un site de restriction *Xho*I permettant de libérer les fragments terminaux de restriction (Figure 1). L'ADN extrait des

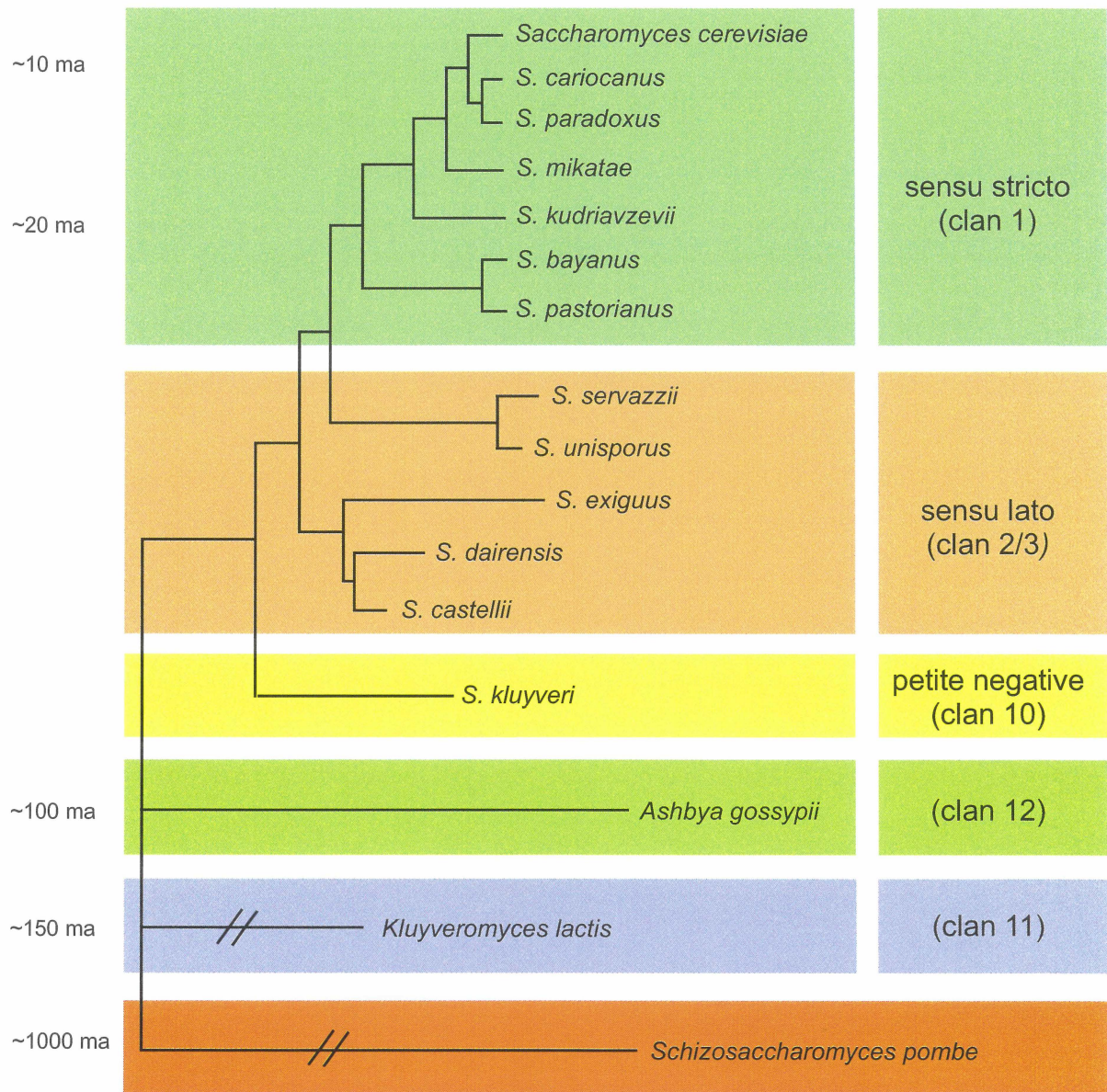


Figure 17. Arbre phylogénétique de *Saccharomyces* et des espèces apparentées. Adapté de Kurtzman, C.P. et Robnett, C.J., 2003. La distance évolutionniste est exprimée en millions d'années (ma). Voir le texte pour des explications plus détaillées.

différentes souches a été digéré par *Xho*I et les bandes télomériques ont été visualisées avec une sonde télomérique de *S. cerevisiae* (Figure 18A). Chez toutes les souches, on observe une hybridation croisée avec la sonde télomérique de *S. cerevisiae* (Figure 18A). À noter que la faible hybridation de *S. bayanus* et *S. pastorianus* (Figure 18A, piste 7 et 8) est due à un mauvais transfert (comparer avec les mêmes pistes de la Figure 18B). La longueur des TRFs diverge cependant d'une souche à l'autre, indiquant que les séquences Y' typiques sont absentes de certaines souches de « *Sensu stricto* ». Cette possibilité a été confirmée par le fait que l'hybridation d'une sonde Y' produit des signaux faibles chez *S. mikatae* et *S. bayanus* (données non montrées). Le fait que le site *Xho*I ne soit pas conservé à travers le complexe « *Sensu stricto* » ne permet pas de comparer la longueur des télomères. Pour ce faire, nous avons digéré l'ADN génomique de ces souches avec *Rsa*I et *Hinf*I et l'avons analysé en Southern à l'aide d'une sonde télomérique de levure (Figure 18B). Grâce à leur courte séquence de reconnaissance, ces enzymes digèrent très fréquemment l'ADN génomique, donc très près des séquences télomériques. Les TRFs ainsi libérés sont plus représentatifs de la longueur des répétitions télomériques et permettent la comparaison d'une espèce à l'autre. *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. cariocanus* et *S. kudriavzevii* ont des télomères oscillant autour de 400 pb (pistes 1, 2, 3, 4 et 6). Par contre, *S. mikatae* et *S. bayanus* ont des télomères plus longs à environ 1 kpb (pistes 5 et 7), alors que les télomères de *S. pastorianus* sont les plus courts à 250 pb (piste 8).

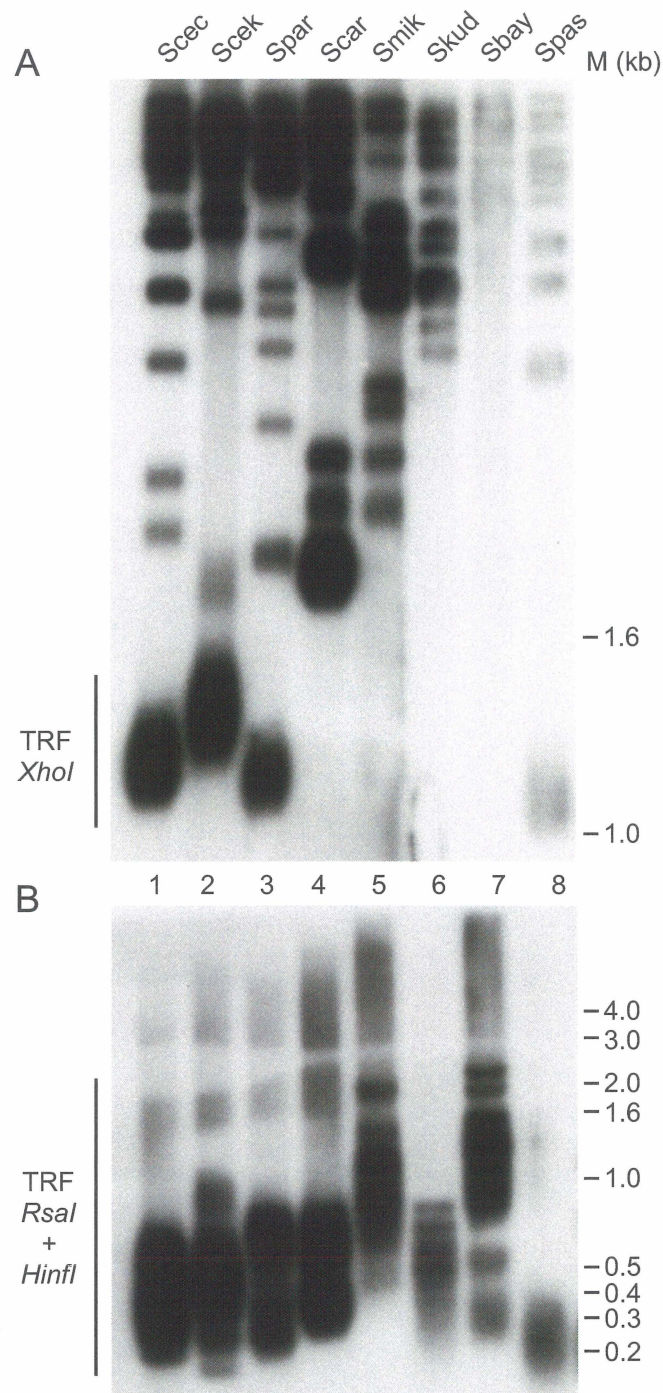


Figure 18. Analyse des fragments terminaux de restriction (TRFs) chez les espèces de *Saccharomyces* appartenant au complexe “Sensu stricto”. L'ADN génomique extrait de *S. cerevisiae* S288C (Scec), *S. cerevisiae* SK1 (Scek), *S. paradoxus* (Spar), *S. cariocanus* (Scar), *S. mikatae* (Smik), *S. kudriavzevii* (Skud), *S. bayanus* (Sbay) et *S. pastorianus* (Spas), a été digéré par *XhoI* (A) ou par *RsaI* combiné à *HinfI* (B) en vue de libérer les TRFs (voir Figure 1) puis analysé par transfert Southern avec une sonde télomérique de *S. cerevisiae*.

CHAPITRE IV

Dissection de la région promotrice de *TLC1* chez *Saccharomyces cerevisiae*

Préambule

Afin d'identifier les séquences promotrices importantes pour la production de TLC1, nous avons effectué une série de délétions ciblant les domaines conservés en amont de l'extrémité 5' prédominante, précédemment caractérisée. Cette approche nous a permis de mettre en évidence des régions cruciales pour le maintien adéquat des télomères *in-vivo*.

Objectif du projet

Chez la levure *S. cerevisiae* le gène *TLC1*, qui encode l'ARN de la télomérase, est transcrit par l'ARN polymérase II. *TLC1* est détecté sous deux formes; une forme est polyadénylée (poly A⁺) peu abondante, et une forme non-polyadénylée (poly A⁻) présente en plus grande quantité. Le processus de maturation de *TLC1* est mal connu, mais des données récentes suggèrent que la forme poly A⁻, vraisemblablement issue de la maturation de la forme poly A⁺ (Chapon et al., 1997), est la forme présente dans le complexe ribonucléoprotéique de la télomérase (Bosoy et al., 2003). L'alignement des séquences d'homologues de *TLC1* a révélé que la région promotrice contient des séquences hautement conservées, pouvant constituer des sites de liaison pour des facteurs impliqués dans la transcription et la régulation du gène. Ce projet consiste à déterminer l'importance de ces séquences dans la transcription et la maturation de *TLC1*, notamment dans la biogénèse des formes poly A⁺ et poly A⁻.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souches

La souche utilisée dans cette étude est CSHY76 (*MATa/α ade2/ade2 ura3/ura3 leu2/leu2 his3/his3 trp1/trp1 TLC1/tlc1::LEU2 RAD52/rad52::TRP1*) obtenue du Dr. C. Greider (Le et al., 1999). Cette souche a été sporulée et les spores issues de la dissection des tétrades ont été testées pour les marqueurs appropriés.

Alignement des séquences

Pour chaque membre du groupe apparenté « *Sensu stricto* », les séquences homologues comprises entre les gènes *PDX3* et *CSG2* ont été amplifiées et séquencées tels que décrit précédemment (Dandjinou et al., 2004b). La séquence de la région intergénique située entre l'ATG du gène *PDX3* et l'extrémité 5' du gène *TLC1* ont été alignées à l'aide du logiciel ClustalW. L'extrémité 5' mature de *TLC1* et ses homologues comportent des nucléotides conservés. Les séquences conservées à l'extrémité 5' mature des homologues de *TLC1*, de même que les premiers nucléotides de la séquence codante des homologues de *PDX3* ont servi de point d'ancrage pour l'alignement. Les alignements grossiers obtenus ont été par la suite optimisés par ajustements manuels (James et al., 1989).

Délétions par PCR

Onze domaines de la région promotrice de *TLC1* ont été ciblés sur la base de leur forte conservation phylogénétique au sein du groupe des « Sensus stricto » (Figure 19). Des fragments successifs couvrant chacun de ces domaines ont été délétés individuellement (G, H, I, J et K) ou en combinaison (A à F, G à K et A à K) grâce à la méthode dite du SOE (splicing by overlapping extensions) (Horton et al., 1993). Cette stratégie de délétion consiste en 3 réactions de PCR mettant à contribution deux amorces internes chevauchantes et deux amorces externes (Tableau 5). Les deux premières réactions de PCR (PCR1 et PCR2) utilisent chacune une amorce externe et une amorce interne pour produire des fragments d'ADN situés de part et d'autres de la séquence à déléter (Tableau 6). Les amorces internes comportent des séquences complémentaires, ce qui permet de rabouter les fragments issus des PCR 1 et 2 au cours d'une troisième réaction de PCR (PCR3). Dans 25 µl des réactions PCR1 et PCR2 on retrouve 10 mM Tris-HCl, pH 8.8, 25 mM KCl, 5 mM (NH₄)₂SO₄, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM de chaque dNTP, 1.5-2.5 U de polymérase Pwo (Roche), 20 pmole de chaque amorce et 50 ng d'ADN génomique de *S. cerevisiae* S288C. L'amplification a été faite en un cycle à 94°C pendant 2 min, ensuite 35 cycles à 94°C pendant 15 s, 50°C pendant 30 s et 72°C pendant 2 min et un cycle final à 72°C pendant 5 min. Les produits des PCR1 et PCR2 ont été purifiés sur gel à l'aide d'une trousse d'extraction QIAquick (QIAGEN). 25 µl de la réaction PCR3 contiennent 10 mM Tris-HCl, pH 8.8, 25 mM KCl, 5 mM (NH₄)₂SO₄, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM de chaque dNTP, 1.5-2.5 U de polymérase Pwo (Roche) et 30 à 120 ng des fragments purifiés PCR1 et PCR2 en proportions équimolaires. La réaction de raboutage des fragments PCR1

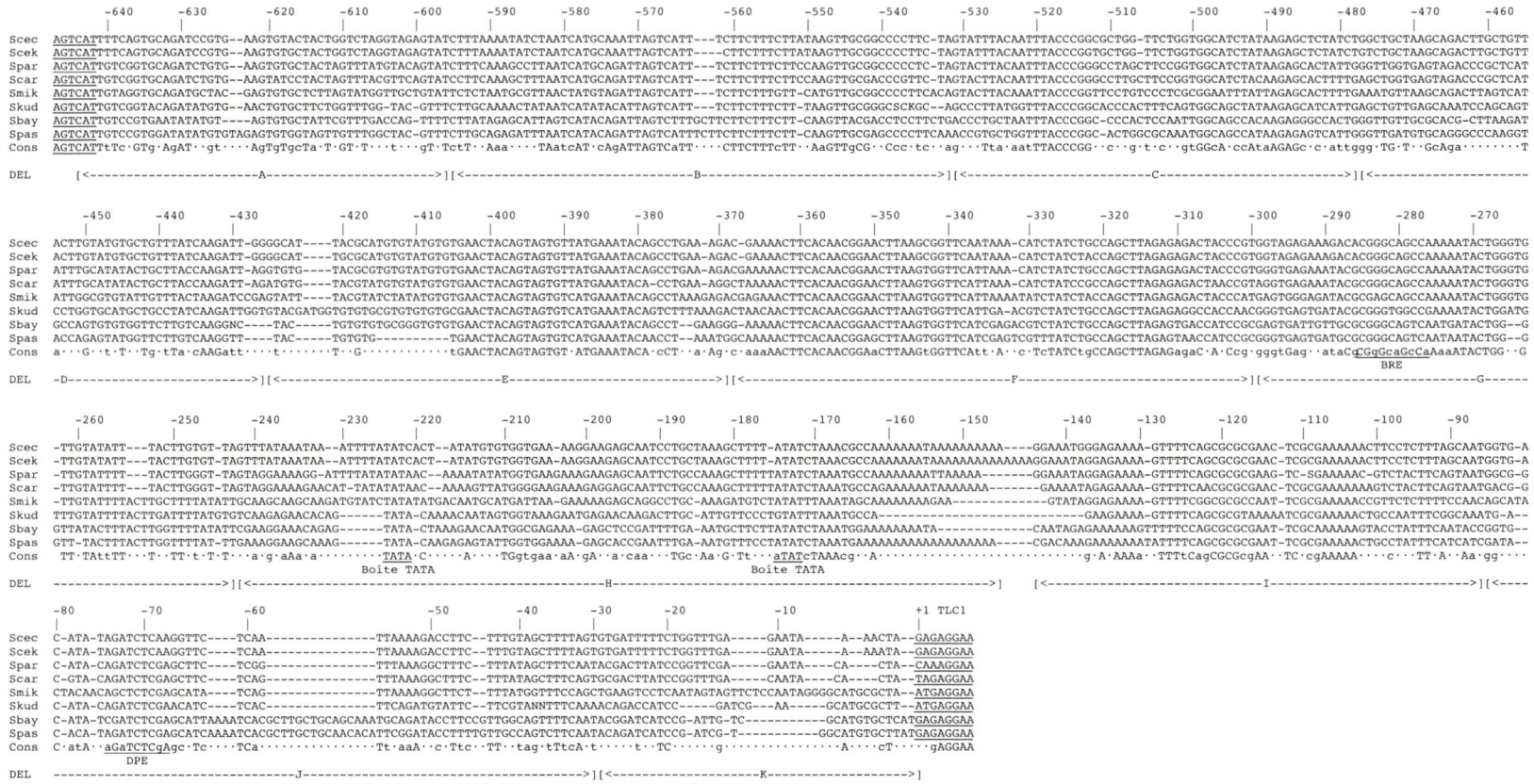


Figure 19. Séquences conservées en amont des séquences codantes de l'ARN de la télomérase dans le groupe des « Ssensu stricto ». Les séquences de la région promotrice du gène de l'ARN de la télomérase de *S. cerevisiae* S288C (Sccec), *S. cerevisiae* SK1 (Sceek), *S. paradoxus* (Spar), *S. cariocanus* (Scar), *S. mikatae* (Smik), *S. kudriavzevii* (Skud), *S. bayanus* (Shbay) et *S. pastorianus* (Spas), ont été alignées tel que décrit dans le texte. Les tirets (-) indiquent des espaces introduits au sein de l'alignement. Le numérotage, indiqué par une barre à chaque 10 nucléotides, a été fait sur la base du premier nucléotide de la séquence codante de *TLC1*. Les premiers nucléotides de la séquence codante des homologues de *TLC1* et *PDX3* sont soulignés. Les motifs BRE, TATA, et DPE généralement retrouvés dans les séquences promotrices des ARN polymérases II sont soulignés. À la ligne de consensus (Cons), les nucléotides conservés au sein de toutes les espèces sont indiqués en lettres majuscules; les lettres minuscules indiquent les nucléotides conservés chez 85% des espèces; les points correspondent au résidu variables. Les limites des séquences déléetées (DEL) sont indiquées par des accolades. L'identité du segment déléeté est inscrite à l'intérieur de l'accolade (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J et K).

Amorce	Séquence (5'→3')
SPE-931TLC1FWD	GGGTAC <u>ACTAGT</u> AGCCTTTCTAGAGGTTCC (SpeI)
SPE-298TLC1FWD	GGGTAC <u>ACTAGT</u> GGTAGAGAAAAGACACGG (SpeI)
SPE+1TLC1FWD	GGGTAC <u>ACTAGT</u> AGAGAGGAAGATAGGTACC (SpeI)
-6TLC1FWD	GAGAGGAAGATAGGTACC
-35TLC1FWD	GTGATTTTTCTGGTTTGAG
-91TLC1FWD	GGTGACATATAGATCTCAAGG
-150TLC1FWD	GGAAATGGGAGAAAAGTTTTTC
-248TLC1FWD	GTTTATAAATAAATTTTATATCAC
-305-224TLC1REV	GTGATATAAAATTTATTTATAAAC ACGGGTAGTCTCTCTAAG
-298+20TLC1REV	GGGTACCTATCTTCCTCTCT ACGGGTAGTCTCTCTAAG
-241-122TLC1REV	AACTTTTCTCCCATTTCT TAACACAAGTAAATATACAACACCC
-150-70TLC1REV	CCTTGAGATCTATATGTCACCT TTTTTTTTTTATTTTTTTGGCG
-87-7TLC1REV	TTCTCAAACCAGAAAAATCAC ATTGCTAAAGAGGAAGTTTTTTTCGCG
-28+20TLC1REV	GGGTACCTATCTTCCTCTCT ACTAAAAGCTACAAAGAAGGTC
+1502TLC1ECOREV	AACAGA <u>ATTCT</u> GGGAAGGTAAATACCACC (EcoRI)
ADH1 TERM FWD	CCGGAATTCGAGCTCAAGCTTTGGACTTCTTCGCC
ADH1 TERM REV	ATCCGCGGACTAGTGGCCGGTAGAGGTGTGG

Tableau 5. Oligonucléotides synthétiques utilisés dans l'étude de la région promotrice de *TLC1*. Les séquences soulignées sont des sites de restriction ajoutés pour les subséquents sous-clonages. Les oligonucléotides comportant des nucléotides en caractère gras comportent les séquences situées de part et d'autre de la région à déléter.

Région délétée	Position de la délétion	PCR1		PCR2	
		Amorce FWD (5'→3')	Amorce REV (5'→3')	Amorce FWD (5'→3')	Amorce REV (5'→3')
G	-243 à -299	SPE-931TLC1FWD	-305-224TLC1REV	-248TLC1FWD	+1502TLC1ECOREV
H	-145 à -242	SPE-931TLC1FWD	-248-129TLC1REV	-150TLC1FWD	+1502TLC1ECOREV
I	-86 à -144	SPE-931TLC1FWD	-150-70TLC1REV	-91TLC1FWD	+1502TLC1ECOREV
J	-30 à -85	SPE-931TLC1FWD	-87-7TLC1REV	-35TLC1FWD	+1502TLC1ECOREV
K	+1 à -29	SPE-931TLC1FWD	-28+20TLC1REV	-6TLC1FWD	+1502TLC1ECOREV
A à F	-298 à -644	SPE-298TLC1FWD	+1502TLC1ECOREV	-	-
G à K	+1 à -299	SPE-931TLC1FWD	-298+20TLC1REV	-6TLC1FWD	+1502TLC1ECOREV
A à K	+1 à -644	SPE+1TLC1FWD	+1502TLC1ECOREV	-	-
WT	-	SPE-931TLC1FWD	+1502TLC1ECOREV	-	-

Tableau 6. Fragments mutants générés par SOE pour l'étude de la région promotrice de *TLC1*. Les oligonucléotides indiqués ont été utilisés au cours de deux réaction de PCR (PCR1 et PCR2) pour générer des fragments chevauchants situés de part et d'autre de la région à déléter. Ces fragments ont été fusionnés au cours d'une troisième réaction de PCR. Voir le texte pour plus de détails.

et PCR2 a été effectuée en un cycle à 94°C pendant 2 min, et de 10 cycles à 94°C pendant 15 s, 50°C pendant 30 s et 72°C pendant 2 min, suivis de 25 cycles d'amplification à 94°C pendant 15 s, 50°C pendant 30 s et 72°C pendant 2 min; 20 pmole de chacune des amorces externes ont été ajoutées durant la première dénaturation du dernier cycle. Les fragments de PCR3 dépourvus des régions promotrices G, H, I, J, K, A à F, G à K et A à K ont été digérés grâce aux sites de restriction uniques *SpeI* et *EcoRI* introduits dans chaque amorce interne, purifiés sur gel tel que mentionné précédemment.

Constructions de plasmides

Dans la phase initiale de ce projet, des fragments contenant divers mutants de délétion de la région promotrice de *TLC1* en amont de la séquence codante ont été introduits dans le vecteur pRS316 (Sikorski et Hieter, 1989). Nous avons cependant constaté qu'une construction dans laquelle pRS316 contient seulement les séquences codantes de *TLC1* (contrôle négatif), c'est-à-dire dont la région promotrice est complètement déléetée, arrive à maintenir ses télomères lors de tests de complémentation dans une souche *tlc1 rad52*. Des analyses en Northern Blot ont par la suite montré que même dépourvu de ses séquences promotrices *TLC1* est transcrit (Stéphanie Larose, communication personnelle), suggérant que des séquences du vecteur situées en amont du gène peuvent servir de promoteur (Marathe et McEwen, 1995). Afin de bloquer cette transcription cryptique (read-through transcription), nous avons effectué une deuxième ronde de clonages dans le vecteur pADCEN26. Pour construire ce vecteur, nous avons amplifié un

fragment de 327 pb du terminateur de transcription du gène *ADH1* (Ammerer, 1983) à l'aide des amorces ADH1TERMF et ADH1TERMR (Tableau 3) avec pGAD-GH (Clontech) comme substrat, puis introduit ce fragment dans le site *SacI* et *SpeI* de pRS316.

Les fragments de PCR3 dénués des régions promotrices G, H, I, J, K, A à F, G à K et A à K) ont été introduits dans pADCEN26 pour générer respectivement les plasmides pADCEN27, pADCEN28, pADCEN29, pADCEN30, pADCEN31, pADCEN32, pADCEN33, pADCEN34 (Tableaux 6 et 7). La digestion par les enzymes de restriction indiquent que les délétions ont bien été introduites. Cependant ces constructions devront être validées par le séquençage des inserts.

Tests de complémentation et analyse des télomères

La capacité des mutants de délétion de la région promotrice de *TLC1* à soutenir la survie de souches *tlc1 rad52* et à maintenir l'homéostasie de la longueur des télomères a été déterminée par des essais de sénescence et par l'analyse de la longueur des télomères en suivant les procédures décrites précédemment (Dandjinou et al., 2004b).

RÉSULTATS

Identification des séquences conservées en amont des gènes de l'ARN de la télomérase. Nous avons cloné et séquencé la région intergénique de *PDX3* et *CSG2* dans huit espèces de *Saccharomyces* constituant le groupe « Ssensu stricto ». L'alignement des séquences situées entre les homologues des gènes *PDX3* et *TLC1* nous a permis d'identifier 11 îlots de régions fortement conservées. Des fragments contigus englobant ces régions conservées ont été désignés A, B, C, D, E, F, G, H, I, J et K (Figure 19). De plus, l'inspection visuelle de ces séquences conservées a permis d'identifier des putatifs motifs généralement retrouvés au sein des noyaux promoteurs de l'ARN polymérase II.

À environ –280 nt de l'extrémité 5' du transcrit mature, se trouve une région conservée présentant de fortes ressemblances avec le site de liaison de TFIIB, BRE (TFIIB Recognition Element). Le consensus du BRE est G/C-G/C-G/A-C-G-C-C (Lagrange et al., 1998). Dans la région –170 à –240, on retrouve des motifs du type boîte TATA répondant au consensus TATA-A/T-A-A/T-A/G (Basehoar et al., 2004). La boîte TATA fonctionne dans les deux directions (Huang et al., 1996) et joue un rôle important dans l'assemblage de la machinerie transcriptionnelle sur le promoteur (Benoist et Chambon, 1981). La région conservée à environ –70 contient la séquence 5'-AGATCTCAA-3', ce qui correspond au consensus du DPE (Downstream Promoter Element: A/G-G-A/T-C/T-G/A/C) (voir discussion).

Identification des éléments de la région promotrice de *TLC1* indispensables à la survie et au maintien de l'homéostasie de la longueur des télomères. Afin de déterminer l'importance des séquences identifiées dans la production d'une forme fonctionnelle de *TLC1*, nous avons eu recours à une stratégie de délétion sélective. Nous avons précédemment généré le plasmide pADCEN36 contenant toute la portion intergénique située entre les gènes *PDX3* et *CSG2* (−930 à +1500), c'est-à-dire la région contenant *TLC1* ainsi que ses séquences promotrices et terminatrices (Dandjinou et al., 2004b). Dans la présente étude, nous avons produit des variants de pADCEN36 (contrôle positif) dans lesquels des segments conservés de la région promotrice ont été délétés individuellement ou en combinaison (Figure 20). Il s'agit des plasmides pADCEN27 (délétion de G), pADCEN28 (délétion de H), pADCEN29 (délétion de I), pADCEN30 (délétion de J), pADCEN31 (délétion de K), pADCEN32 (délétion de A à F: région distale), pADCEN33 (délétion de G à K: région proximale) et pADCEN34 (délétion de A à K: contrôle négatif).

Nous avons introduit ces constructions dans une souche de levure dépourvue de toute activité de maintien des télomères suite à la délétion génomique des gènes *TLC1* et *RAD52* (*tlc1 rad52*). Lorsque le promoteur est intact, les cellules survivent normalement (voir Tableau 6, pADCEN36) et les TRFs sont maintenus à ~1.3 kpb (Figure 21, pistes 16 et 17). Par contre, en absence de *TLC1* ou de sa région promotrice (pADCEN26 et pADCEN34), les cellules entrent en sénescence au bout de 60 à 80 générations (Tableau 6, vide et délétion de A à K) et les télomères sont excessivement courts dès 30 générations (Figure 21,

	YC-TRP-LEU-URA				5'-FOA	YC-TRP-LEU			
	40G	60G	80G	100G	120G, 20G ^a	140G, 40G ^a	160G, 60G ^a	180G, 80G ^a	200G, 100G ^a
G (pADCEN27)	++	++	++	++	++	++	++	+/-	-
H (pADCEN28)	++	++	++	++	++	++	+/-	-	
I (pADCEN29)	++	+/-	-						
J (pADCEN30)	++	++	++	++	++	+/-	+/-	-	
K (pADCEN31)	++	++	++	++	++	+/-	+/-	-	
A à F (pADCEN32)	++	++	++	++	++	++	+/-	-	
G à K (pADCEN33)	++	++	++	++	-				
A à K (pADCEN34)	+/-	+/-	-						
Vide (pADCEN26)	+/-	-							
WT (pADCEN36)	++	++	++	++	++	++	+/-	+/-	-

Tableau 7. Survie des souches arborant des délétions de la région promotrice de *TLC1*. Des plasmides contenant le gène *TLC1* avec des délétions dans divers segments de la région promotrice ont été construits et nommés comme suit: pADCEN27 (délétion de la région G), pADCEN28 (délétion de la région H), pADCEN29 (délétion de la région I), pADCEN30 (délétion de la région J), pADCEN31 (délétion de la région K), pADCEN32 (délétion des régions A à F: distales à *TLC1*), pADCEN33 (délétion des régions G à K: proximales à *TLC1*), pADCEN34 (délétion des régions A à K: promoteur entier délété) et pADCEN26 (plasmide vide). La souche diploïde CSHY76 a été transformée avec chacun de ces plasmides. Après sporulation et dissection des tétrades, les double mutants *tlc1 rad52* ont été sélectionnés. La capacité des plasmides à soutenir la croissance a été déterminée par passages successifs sur milieu solide YC-TRP-LEU jusqu'à 100 générations. Par la suite, les cellules qui survivent au delà de 100 générations sont successivement poussées sur milieux 5-FOA et YC-TRP-LEU pour confirmer la dépendance du plasmide. Pour chaque délétion, deux colonies indépendantes ont été suivies et se comportent de façon identique. La souche isogénique sauvage (WT) a été traitée de façon similaire aux mutants et sert de contrôle positif. Le plasmide vide sert de contrôle négatif. La viabilité est déterminée selon la taille de la colonie après 3 jours. Abréviations: ++, croissance normale et similaire au contrôle positif; -, absence de croissance; +/-, croissance intermédiaire.

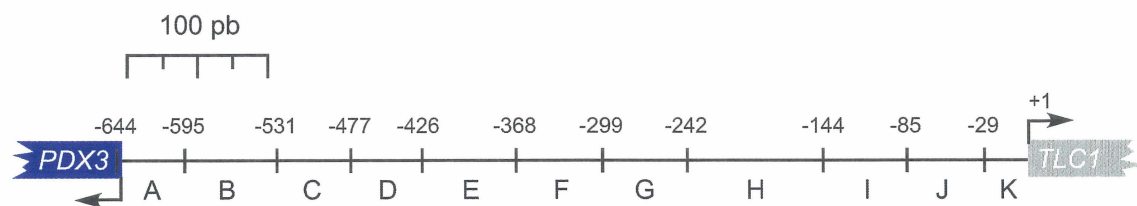


Figure 20. Aperçu schématique de la région intergénique de *PDX3* et *TLC1*. L'ATG de *PDX3* et le premier nucléotide de la séquence codante de *TLC1* sont représentés par une flèche. Les segments A à K ont été délétés individuellement ou en combinaison. Les limites de ces segments sont indiquées par leurs coordonnées par rapport au +1 de *TLC1*.

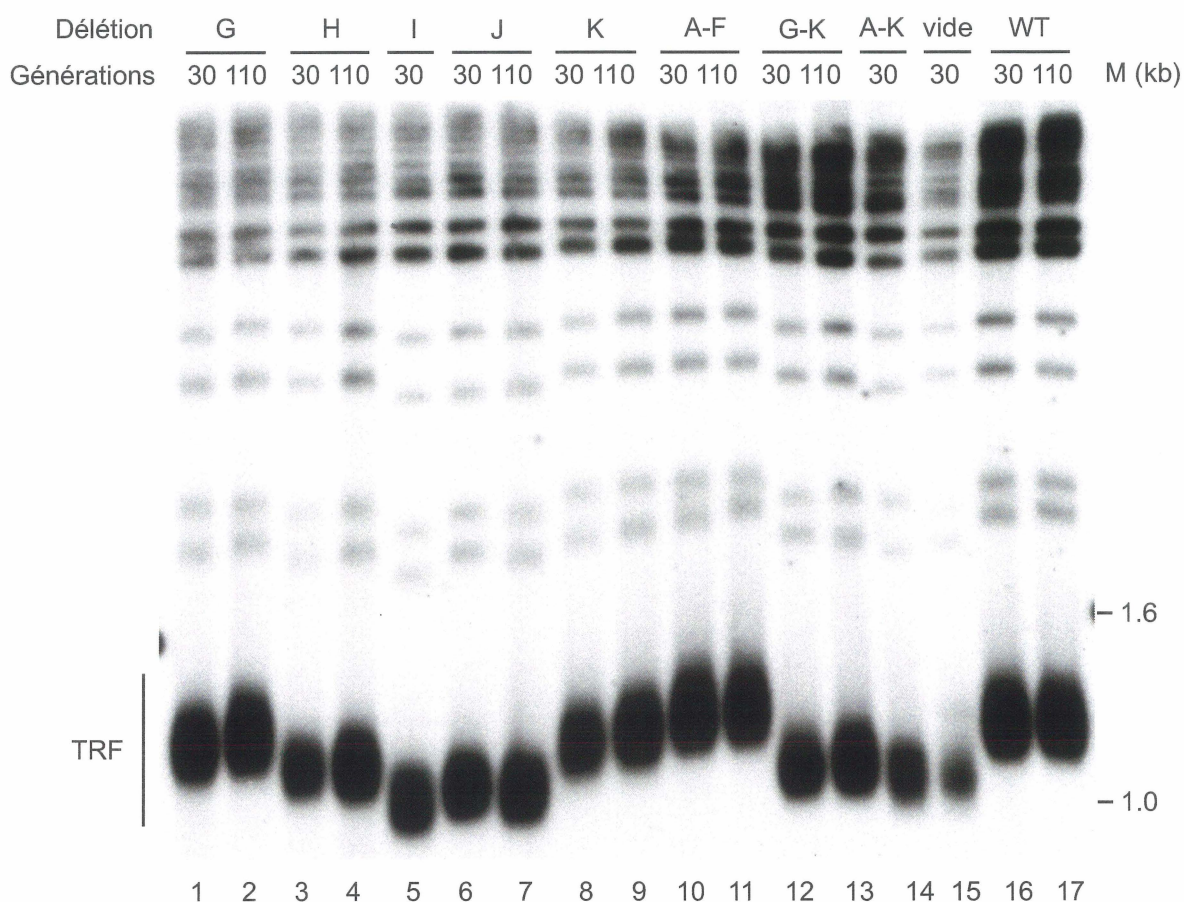


Figure 21. Effets des délétions dans la région promotrice de *TLC1* sur le maintien des télomères. Pour chaque souche indiquée au Tableau 4, une colonie indépendante a été prélevée après 20 générations (pétris de transformation) et 100 générations (quatrième passage après transformation), puis inoculée en milieu liquide pour environ 10 générations additionnelles. L'ADN génomique a été préparé à partir de ces cultures, digéré par *Xho*I en vue de libérer les TRFs (voir Figure 1) et analysé par transfert Southern avec une sonde télomérique. La souche isogénique sauvage (WT) a été traitée de façon identique et sert de contrôle positif.

pistes 14 et 15). Ce résultat est attendu puisque *TLC1* est une composante essentielle pour l'activité de la télomérase. En déléant complètement la région intergénique de *PDX3* et *TLC1*, le gène *TLC1* est privé de ses régions promotrices et n'est pas transcrit. Cette situation conduit à la sénescence. Nous avons cependant noté que malgré l'absence du promoteur, *TLC1* peut être transcrit par des séquences cryptiques présentes dans le vecteur (données non montrées). Cette transcription a été abolie grâce à l'insertion du terminateur de transcription du gène *ADH1* dans le vecteur pADCEN26, en amont du site où les fragments de délétion ont été insérés. Une souche arborant une délétion de la partie distale de la région du promoteur de *TLC1* (pADCEN32: A à F) se comporte comme le contrôle positif puisque ni la croissance cellulaire (Tableau 7, délétions de A à F), ni l'homéostasie de la longueur des télomères ne sont affectées (Figure 21, pistes 10 et 11). Ce résultat suggère que la région promotrice G à K comprend tous les éléments nécessaires à la transcription efficace de *TLC1*. Par contre, dans une souche contenant une délétion de la partie proximale du promoteur de *TLC1* (pADCEN33: G à K), on n'observe pas de sénescence (Tableau 7, délétion de G à K) quoique les télomères soient maintenus courts (Figure 21, pistes 12 et 13), indiquant que la région A à F (région distale) ne peut soutenir une qualité et/ou un niveau de transcription nécessaires au maintien des télomères. Puisque la région G à K (proximale) semble déterminante pour la transcription de *TLC1*, il était intéressant de disséquer plus en détail cette région afin d'identifier quels éléments spécifiques sont impliqués dans l'expression de *TLC1*. De toutes les délétions individuelles effectuées dans les segments G, H, I, J et K, seule la région I

semblait être critique pour la survie (Tableau 7, pADCEN29) et la longueur des télomères de la souche hôte (Figure 21, piste 5 et 6). Ces résultats renforcent la proposition selon laquelle des séquences spécifiques de la région G à K sont cruciales pour la production d'un ARN fonctionnel.

CHAPITRE V

Étude des interactions régissant la formation du putatif pseudonoeud I dans l'ARN de la télomérase chez *Saccharomyces cerevisiae*

Préambule

Afin de confirmer les interactions tertiaires nécessaires à la formation du pseudonoeud, nous avons effectué une série de mutations abolissant ou rétablissant la complémentarité des segments d'ARN potentiellement impliqués (715-722/761-768). L'analyse des données suggère que si le pseudonoeud se forme *in-vivo*, il est suffisamment flexible pour adopter des conformations alternatives grâce à des appariements cryptiques.

Objectif du projet

En dépit des divergences significatives dans les séquences primaires et les tailles, l'analyse phylogénétique a permis de mettre en évidence un pseudonoeud essentiel et ubiquitaire au sein de l'ARN de la télomérase des ciliés, des vertébrés et de la levure *K. lactis* (ten Dam et al., 1991; Chen et al., 2000; Tzfati et al., 2003). Récemment, nous avons établi un modèle de structure secondaire pour l'ARN de la télomérase chez la levure *S. cerevisiae* et proposé la présence d'un pseudonoeud (Dandjinou et al., 2004b). Cette structure tertiaire se retrouve au sein d'un segment d'ARN indispensable à l'association de la transcriptase inverse et dont la délétion entraîne le raccourcissement des télomères et la sénescence (Livengood et al., 2002). Nos observations suggèrent que la formation de ce pseudonoeud pourrait contribuer à la liaison de la transcriptase inverse et à la catalyse enzymatique. Nous voulons donc identifier les interactions nucléotidiques essentielles à la formation du pseudonoeud et évaluer son importance pour la stabilité de la longueur des télomères chez *S. cerevisiae*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souches

La souche utilisée dans cette étude est CSHY76 (*MATa/α ade2/ade2 ura3/ura3 leu2/leu2 his3/his3 trp1/trp1 TLC1/tlc1::LEU2 RAD52/rad52::TRP1*) obtenue du Dr. C. Greider (Le et al., 1999). Cette souche a été sporulée et les spores issues de la dissection des tétrades ont été testées pour les marqueurs appropriés.

Délétions par PCR

Nous avons proposé que chez *S. cerevisiae*, la formation du pseudonoeud pourrait reposer sur la complémentarité des segments d'ARN comprenant les nucléotides 5'-715-722-3' et 5'-761-768-3'. Nous avons utilisé la stratégie de PCR par SOE décrite au chapitre précédent afin de substituer les nucléotides présents sur ces deux segments. Les amorces utilisées pour introduire ces mutations sont répertoriées au tableau 8 et les fragments générés sont inscrits au tableau 9. Ces fragments contiennent le gène *TLC1* muté flanqué de ses séquences promotrices et terminatrices (voir étude précédente).

Constructions de plasmides

Les fragments de PCR3 correspondant aux différents mutants ont été introduits dans le site *SpeI-EcoRI* de pADCEN26 pour générer respectivement les plasmides

Amorce	Séquence (5'→3')
SPE-931TLC1FWD	GGGTACA <u>CTAGT</u> AGCCTTTCTAGAGGTTCC (SpeI)
+1502TLC1ECOREV	AACAGAATTCGGGAAGGTAAATACCACC (EcoRI)
DISRIVbFWD	TCTTATTTTCCCACTACAAAAAGG
DISRIVbREV	TGTAGTGGGAAAATAAGATTTAAAGGCAAAAAT
COMPIVbFWD	TTTATTCTTCCCACTACAAAAAGG
COMPIVbREV	TGTAGTGGGAAGAATAAATTTAAAGGCAAAAATC
COMPIVaFWD	AGAATAAAAGTTTTTTCCGTTTTTTC
COMPIVaREV	CGGAAAAAACTTTTATTCTCCATTTCTATATATAC
BAYAIVbFWD	AGAGTCAATCCCACTACAAAAAGG
BAYAIVbREV	TGTAGTGGGATTGACTCTTTTAAAGGCAAAAATC

Tableau 8. Oligonucléotides utilisés dans l'étude du pseudonoeud I. Les séquences soulignées sont des sites de restriction ajoutés pour les subséquents sous-clonages.

Mutant du pseudonoeud	PCR1		PCR2	
	Amorce FWD (5'->3')	Amorce REV (5'->3')	Amorce FWD (5'->3')	Amorce REV (5'->3')
Interruption totale (pADCEN50)	SPE-931TLC1FWD	DISRIVbREV	DISRIVbFWD	+1502TLC1ECOREV
Interruption partielle (pADCEN51)	SPE-931TLC1FWD	COMPIVbREV	COMPIVbFWD	+1502TLC1ECOREV
Rétablissement (pADCEN52)	SPE-931TLC1FWD	COMPIVaREV	COMPIVaFWD	+1502TLC1ECOREV
Bayanus (pADCEN53)	SPE-931TLC1FWD	BAYAIVbREV	BAYAIVbFWD	+1502TLC1ECOREV

Tableau 9. Fragments mutants générés par SOE pour l'étude du pseudonoeud I. Les oligonucléotides indiqués ont été utilisés au cours de deux réaction de PCR (PCR1 et PCR2) pour générer des fragments chevauchants situés de part et d'autre de la région à déléter. Ces fragments ont été fusionnés au cours d'une troisième réaction de PCR. Voir le texte pour plus de détails.

pADCEN50 (interruption totale), pADCEN51 (interruption partielle), pADCEN52 (rétablissement) et pADCEN53 (*S. bayanus*; Figure 22). Pour chaque construction, la délétion a été confirmée par séquençage des deux brins de l'insert.

Tests de complémentation et analyse des télomères

Les tests de complémentation des mutants de délétion de la région promotrice dans les souches *tlc1 rad52*, de même que l'analyse de la longueur des télomères ont été réalisés selon les procédures décrites précédemment (Dandjinou et al., 2004b).

RÉSULTATS

Importance du pseudonoeud I de l'ARN de la télomérase de *S. cerevisiae* pour la survie et le maintien de l'homéostasie de la longueur des télomères. L'analyse phylogénétique d'homologues de *TLC1* dans le groupe des *Saccharomyces* « *Sensu stricto* » utilisée conjointement avec des analyses par sondes biochimiques nous a permis de proposer un modèle de la structure de l'ARN de la télomérase chez la levure (Dandjinou et al., 2004b). Dans cette structure, nous avons mis en évidence une putative structure tertiaire résultant de l'appariement entre les boucles des hélices V et VI, le pseudonoeud I. La présence d'un pseudonoeud dans l'ARN de télomérase semble universellement conservée puisque ce type de structure se retrouve également chez les ciliés et les vertébrés, ainsi que chez la levure *K. lactis* (ten Dam et al., 1991; Chen et al., 2000; Tzfati et al., 2003). Dans ces organismes, le pseudonoeud est essentiel à la liaison de la sous-unité catalytique de la télomérase TERT à l'ARN et/ou au maintien des télomères (Gilley et Blackburn, 1999; Autexier et al., 1996; Bachand et al., 2001; Martin-Rivera et Blasco, 2001; Ly et al., 2003b). Des délétions effectuées dans *TLC1*, combinées à des essais d'immunoprécipitation, ont démontré que la région centrale de *TLC1* est également indispensable pour l'association de Est2p (Livengood et al., 2002). Comme ce domaine d'association coïncide avec la région du pseudonoeud, nous avons voulu vérifier l'importance de l'interaction entre les boucles des hélices V et VI pour l'activité télomérase *in-vivo*. La stratégie classique pour ce genre d'analyse génétique consiste à altérer les nucléotides

participant à l'appariement et à observer les phénotypes associés, c'est-à-dire l'apparition de la sénescence et la longueur des télomères. Nous avons généré quatre mutants de *TLC1* dans lesquels les interactions putatives entre les boucles impliquées dans le pseudonoeud ont été modifiées par substitution des nucléotides (Figure 22). Ces mutants ont été créés de façon à interrompre l'interaction totalement (Figure 22B), partiellement (Figure 22C) ou à rétablir l'interaction à l'aide de résidus différents (Figure 22D). L'ARN de la télomérase des autres membres du groupe des « *Sensu stricto* » était capable de se substituer à *TLC1* chez *S. cerevisiae*, sauf celui de *S. bayanus*. Comme la nature des nucléotides contribuant à la formation du pseudonoeud chez *S. bayanus* diffère de celles des autres « *Sensu stricto* », nous avons postulé que l'incapacité de l'homologue de *TLC1* chez *S. bayanus* pouvait être due à cette différence structurale. Nous avons donc remplacé les nucléotides impliqués dans l'interaction chez *S. cerevisiae* par ceux de *S. bayanus* (Figure 22E). Ces mutants ont été clonés dans le vecteur pADCEN26 (contrôle négatif) pour générer les plasmides pADCEN50 (interruption totale), pADCEN51 (interruption partielle), pADCEN52 (rétablissement) et pADCEN53 (bayanus). Le plasmide pADCEN36 (contrôle positif) contient le gène de type sauvage *TLC1*. Nous avons transformé ces plasmides dans une souche de levure dépourvue de toute activité de maintien des télomères à cause de la délétion génomique des gènes *TLC1* et *RAD52* (*tlc1 rad52*).

La capacité des différents mutants à soutenir la survie des souches *tlc1 rad52* a été déterminée par passages successifs sur les milieux sélectifs appropriés. Lorsque le pseudonoeud est intact (Figure 22A), les cellules survivent

Structures	Mutants	Survie
<p>A</p> <p>3' Hélice VI</p> <p>5' Hélice V</p>	WT (pADCEN36)	++
<p>B</p> <p>3'</p> <p>5'</p>	Interruption totale (pADCEN50)	++
<p>C</p> <p>3'</p> <p>5'</p>	Interruption partielle (pADCEN51)	++
<p>D</p> <p>3'</p> <p>5'</p>	Rétablissement (pADCEN52)	++
<p>E</p> <p>3'</p> <p>5'</p>	<i>S. bayanus</i> (pADCEN53)	++

Figure 22. Mutations de substitution dans le putatif pseudonoeud I. L'appariement au niveau des boucles des Hélices V et VI (A) a été proposé suite à l'analyse phylogénétique de l'ARN de la télomérase chez les souches *Saccharomyces* du groupe des "Sensu stricto". Quatre différents mutants de substitution ont été générés de façon à modifier les interactions du pseudonoeud (voir tableau 8): interruption totale (B), partielle (C) ou rétablissement (D). L'appariement spécifique observé chez *S. bayanus* (E) a également été testé. Ces différents mutants ont été introduits chez *S. cerevisiae* afin de tester leur capacité à soutenir la survie. ++ indique une croissance normale similaire au WT.

normalement. Étonnamment, toutes les souches dans lesquelles les séquences complémentaires du pseudonoeud ont été interrompues (Figures 22B et 22C) ont une croissance identique au contrôle positif. Ces résultats indiquent que contrairement aux vertébrés, aux ciliés et à *K. lactis*, les interactions du pseudonoeud que nous avons identifié ne sont pas essentielles à la survie de *S. cerevisiae*.

DISCUSSION

Détermination du rôle de *CDC13* dans la formation d'un profil de réplication aberrant aux télomères d'un chromosome artificiel

Des télomères aux extrémités franches sont créées lors de la synthèse du brin avancé. Il a été proposé qu'à ces extrémités, le brin C-riche soit réséqué pour générer une extension simple brin G-riche, substrat de la télomérase (Wellinger et al., 1996; Makarov et al., 1997; Diede et Gottschling, 2001). Les activités enzymatiques responsables de la formation de cette structure n'ont pas encore été caractérisées (Larrivée et al., 2004). Au cours de son projet doctoral, Julie Parenteau a analysé en gel 2D divers mutants de la voie de la télomérase dans le but de retrouver des facteurs dont l'absence peut affecter la formation du brin G-riche. Un de ces facteurs, Cdc13p, s'associe spécifiquement au brin G-riche où il joue un rôle essentiel dans la protection des télomères et la coordination de la réplication télomérique. Dans une souche de type sauvage *CDC13*, la réplication du chromosome artificiel pRW11L se produit à partir de son origine de réplication (ARSH4) localisée en position légèrement excentrée, ce qui se traduit par un profil en 2D de type « bulle à Y ». Par contre chez le mutant *cdc13-2*, la réplication d'un chromosome artificiel semblait se faire selon un profil « Y » caractéristique d'une origine de réplication située aux extrémités. *cdc13-2* était déjà caractérisée comme une mutation de séparation entre les fonctions de réplication et de recrutement de *CDC13* (Lingner et al., 1997a; Nugent et al., 1996; Evans et Lundblad, 1999; Pennock et al., 2001; Qi et Zakian, 2000; Evans et Lundblad, 2002). L'initiation de

la réplication par les télomères dans la souche MVL26A indiquerait que le gène *CDC13* possède des fonctions additionnelles ou que la fonction de protection des télomères inclut la prévention d'événements de réplication inappropriés.

Nous avons donc effectué l'analyse comparative en gels 2D des profils de réplication de pRW11L extrait d'une souche MVL26A ou d'une souche de type sauvage *CDC13* (Figure 12). Dans les deux cas, le profil de réplication est du type « bulle à Y », indiquant que la réplication du chromosome artificiel se produit essentiellement par l'origine de réplication interne dans les cellules MVL26A (Parenteau, 2002).

Le gel 2D est une technique éprouvée pour l'étude des intermédiaires de réplication (Dandjinou et al., 2004a). Les variantes de cette technique permettent d'analyser différents phénomènes associés au mouvement de la fourche de réplication. La technique que nous avons employée dans le cadre de cette étude est dite neutre/neutre puisque l'ADN est séparé en conditions non-dénaturantes dans les deux dimensions. Bien que très sensible et nécessitant peu d'ADN, cette technique montre cependant certaines limitations. Il a été démontré que lorsque l'origine de réplication se trouve près de l'extrémité du fragment à analyser, le signal attendu n'est pratiquement pas détecté (Linskens et Huberman, 1990). C'est justement dans cette situation que nous nous trouvons en essayant de détecter un signal de type « Y » d'une réplication initiée aux télomères. Il se peut donc que l'ambiguïté dans les résultats obtenus par Julie Parenteau soit due à cette limitation. Cet inconvénient peut cependant être résolu en utilisant une

alternative au gel 2D neutre/neutre, c'est-à-dire le gel 2D neutre/alcalin (Huberman, 1990).

Identification de gènes dont la surexpression supprime le phénotype de sénescence associé à l'absence d'activité télomérase et de recombinaison homologue.

Bien que Cdc13p ne semble pas avoir un rôle direct dans la réplication aux télomères (voir Chapitre I), sa présence est essentielle, notamment pour recruter la télomérase aux télomères. Chez la levure *S. cerevisiae*, à l'instar de la plupart des cellules eucaryotes immortelles, la télomérase est le principal mécanisme de maintien de l'homéostasie de la longueur des télomères. Malgré le défaut de prolifération associé à l'absence de composantes de la télomérase, par exemple chez des mutants *est1*, *est2*, *est3* ou *tlc1* (Lendvay et al., 1996; Singer et Gottschling, 1994), une faible population de levures a la capacité d'échapper à la sénescence répllicative (Lundblad et Blackburn, 1993). Ces cellules rallongent leurs télomères par un mécanisme de secours basé sur la recombinaison homologue contrôlée par *RAD52* (Le et al., 1999; Teng et al., 2000) et facilitée par *EXO1* (Maringele et Lydall, 2004; Bertuch et Lundblad, 2004). Deux modèles ont été proposés pour expliquer la façon dont la recombinaison rétablit les télomères. Le premier modèle suggère que les survivants proviennent d'une série d'événements de recombinaison qui confèrent un avantage de croissance (Louis et Haber, 1990). Le second modèle propose que les télomères très courts entraînent l'ouverture du télosome, ce qui augmente la probabilité d'événements

de recombinaison (Teng et Zakian, 1999). En absence de télomérase et de *RAD52*, aucun survivant n'a été mis en évidence à ce jour, vraisemblablement parce que les mécanismes supplétifs sont absents ou n'ont pas le temps de se mobiliser.

Nous avons pensé que si des mécanismes de remplacement existent, mais à de faibles niveaux, changer le dosage de certains facteurs pouvait faciliter leur émergence (Rine, 1991). Notre stratégie consistait à générer des mutants *tlc1 rad52* par contre-sélection du plasmide de complémentation sur milieu 5-FOA puis à cribler une librairie génomique de levure en vue d'identifier des gènes dont la surexpression supprime le phénotype de sénescence des souches *tlc1 rad52*. Cette approche nous a permis d'isoler six clones plasmidiques. Les gènes et ORFs portés par l'un de ces plasmides ont été sous-clonés afin d'identifier et de confirmer le facteur responsable de la survie prolongée des souches *tlc1 rad52*.

Nous avons ainsi isolé *NET1*. Net1p est une phosphoprotéine qui régule plusieurs aspects de l'organisation et la fonction du nucléole. Durant les phases G1, S, et le début de la mitose, Net1p est hypophosphorylée et séquestre la phosphatase Cdc14p au sein d'un complexe nucléolaire appelé RENT (REGulator of Nucleolar silencing and Telophase). Net1p se comporte alors comme un inhibiteur compétitif de Cdc14p, en l'empêchant d'exercer son activité phosphatase essentielle pour sortir de la mitose (Traverso et al., 2001). Suite à la phosphorylation de Net1p par une kinase dépendant de Tem1p, le blocage induit par Net1p cesse à l'anaphase/télophase et Cdc14p est relachée du nucléole. Une fois libérée, Cdc14p peut déphosphoryler ses cibles nucléaires (Visintin et al.,

1998; Zachariae et al., 1998), ce qui permet l'entrée en G1. Au cours de la phase G1, Cdc14p provoque à nouveau sa propre séquestration (inactivation) au RENT en déphosphorylant Net1p (Shou et al., 1999). Le RENT retient également la protéine Sir2p, une histone déacétylase dépendant du NAD^+ (Imai et al., 2000; Landry et al., 2000). Sir2p est la seule des protéines Sir indispensable à l'atténuation (silencing) de l'ADN ribosomal (ADNr), suggérant un mécanisme d'atténuation différent à ce locus. Indépendamment de sa présence au RENT, Sir2p forme avec Sir3p et Sir4p un complexe associé aux télomères (Hecht et al., 1996; Strahl-Bolsinger et al., 1997; Pryde et Louis, 1999), aux loci nucléaires de mating-type *HML/HMR* (Moazed et al., 1997; Moretti et al., 1994; Hecht et al., 1995) et aux sites de dommages de l'ADN (Mills et al., 1999; Lee, 1999). Sir2p participe à la répression de la recombinaison de l'ADNr (Gottlieb et Esposito, 1989) à travers sa séquestration au RENT (Straight et al., 1999). La recombinaison des unités répétitives de l'ADNr produit des ERCs (Extrachromosomal rDNA Circles), qui provoquent le vieillissement cellulaire de la levure (Sinclair et Guarente, 1997). Ainsi, Sir2p est un facteur anti-vieillessement qui, du fait de sa dépendance au NAD^+ , établit une corrélation entre l'apport calorique et le vieillissement (Lin et al., 2000).

La présence quasi ubiquitaire de Sir2p à divers loci cellulaires ainsi que son rôle dans la prévention du vieillissement, permettent d'émettre plusieurs hypothèses pour expliquer l'immortalisation des souches *tlc1 rad52* lorsque Net1p est surexprimée. De façon constitutive, les quantités de Sir2p sont limitantes aux télomères et à l'ADNr, mais pas aux loci *HML/HMR* (Cockell et Gasser, 1999). La

surproduction de Net1p au nucléole peut accroître indûment la séquestration de Cdc14p, ce qui se traduirait par un rallongement de la portion du cycle cellulaire entre deux télophases. Ce ralentissement serait favorable à la réparation d'éventuels dommages à l'ADN. La grande quantité de Net1p au nucléole peut également augmenter la concentration de Sir2p au RENT, ce qui pourrait accentuer la répression des ERCs et favoriser la longévité des cellules (Defossez et al., 1999). Les loci *HML/HMR* d'une cellule haploïde expriment normalement l'information "a" ou " α ", mais pas les deux simultanément. Les cellules qui expriment simultanément les mating type a et α ont un phénotype d'hyper-recombinaison qui se traduit par une formation accrue des ERCs et favorise le phénomène de vieillissement. La présence du complexe Sir2p/Sir3p/Sir4p aux loci *HML/HMR* empêche la double expression du mating type a/ α et contribue à ralentir le vieillissement cellulaire (Kaeberlein et al., 1999). Autrement dit, toute situation biologique favorisant la répression des loci *HML/HMR* pourrait favoriser la longévité de la levure. Une étude récente suggère que la surexpression de Net1p met la cellule dans un tel contexte (Kasulke et al., 2002). Lorsque la protéine Net1p est surexprimée, elle se localise aux loci *HML/HMR* de façon Sir-dépendant et contribue à accentuer la répression des loci *HML/HMR*. Cette observation supporte l'idée selon laquelle la surexpression de Net1p dans des cellules *tlc1 rad52* pourrait favoriser leur longévité. Cependant, les mécanismes de cette longévité accrue demeurent spéculatifs. Une possibilité qui n'a pas été investiguée est le changement de la structure du télosome suite à la déplétion de Sir2p des télomères. La surproduction de Net1p pourrait en effet appauvrir les télomères en

Sir2p, ce qui favoriserait une configuration « ouverte » du télosome et augmenterait la probabilité que des événements de recombinaison puissent maintenir les télomères (Teng et Zakian, 1999).

L'analyse en Southern de l'ADN génomique des survivants *tlc1 rad52* a montré que le gène *RAD52* se retrouve intégré dans le génome après une série de passages en milieu liquide. Il faut noter que la perte des gènes *TLC1* et *RAD52* a été vérifiée et confirmée au tout début de l'étude. Plusieurs facteurs pourraient avoir contribué à la résurgence de *RAD52*. D'abord, le gène *RAD52* a été inactivé par insertion du marqueur *HIS3*, laissant environ 1200 et 900 pb de séquences *RAD52* respectivement en amont et en aval du fragment *HIS3*. Au cours de la contre-sélection des mutants *tlc1 rad52* sur milieu 5-FOA, la pression de sélection imposée aux cellules combinée à la forte homologie de séquence entre le plasmide de complémentation pAZ1RAD52 et les séquences génomiques a probablement favorisé la réintégration du gène *RAD52*.

À la lumière de cette donnée, les hypothèses émises précédemment pour expliquer la survie des souches *tlc1 rad52*, pourraient en fait s'appliquer à de simples mutants *tlc1*. Il faut cependant noter que nous n'avons pas effectué des passages à partir de souches *tlc1* surexprimant *NET1*. Par contre, nous n'avons été en mesure de retrouver des survivants *tlc1 rad52* par surexpression de *Net1p* dans la souche CSHY76. D'ailleurs, des résultats obtenus récemment par Pillus et ses collaborateurs tendent à corroborer l'idée d'une survie accrue des souche *tlc1* par surexpression de *NET1* (Lowell et al., 2003). De plus, les études effectuées par de ce groupe contredisent l'hypothèse de la répression du mating type sur la

longévité. La co-expression des deux informations *HML/HMR* conduit à la formation d'un hétérodimère $\alpha 1/\alpha 2$ qui altère la transcription d'une multitude de gènes exclusifs aux cellules haploïdes, ce qui pourrait favoriser des activités normalement faibles ou réprimées. Afin de tester l'effet du type cellulaire sur la survie des souches *tlc1*, ces chercheurs ont introduit un plasmide exprimant le *Mata* dans une souche α . Leurs résultats montrent qu'en absence de télomérase, cette dérégulation simultanée des loci *HML/HMR* empêche l'apparition de la sénescence. Comme la dérégulation des loci *HML/HMR* peut également être provoquée par la délétion des protéines Sir, ces chercheurs ont testé l'effet de la délétion des protéines Sir sur la survie des souches *tlc1*. Tel qu'anticipé, l'absence des Sir prévient également l'apparition de la sénescence répllicative. Il semble qu'en surexprimant Net1p nous ayons mis en évidence un mécanisme de facilitation de la survie en absence d'activité télomérase. Ce processus reste cependant dépendant de la présence de *RAD52* puisque la délétion des protéines Sir dans les souches *tlc1 rad52* ne permet pas de contrecarrer la sénescence. Les mécanismes à la base de cette facilitation ne sont pas connus, et les données sur le mating type sont contradictoires (Kasulke et al., 2002; Lowell et al., 2003). Cependant, la dérégulation du télosome suite à la séquestration de Sir2p au nucléole et aux loci des mating type pourrait également contribuer à faciliter la recombinaison et devrait être explorée, par exemple en testant le TPE (Gottschling et al., 1990; de Bruin et al., 2000a).

Le design expérimental que nous avons utilisé pour retrouver des nouveaux facteurs contribuant au maintien des télomères dans les souches *tlc1 rad52* n'a

pas permis de compléter le criblage de la librairie. La stratégie de criblage basée sur la surexpression de gènes demeure cependant un outil élégant pour aborder l'étude de nouveaux mécanismes de maintien de l'homéostasie de la longueur des télomères. Connaissant les limites de cette approche, il serait intéressant d'utiliser de nouvelles souches *tlc1* et *tlc1 rad52*, d'une part pour confirmer la survie de tous les candidats obtenus, mais aussi afin de compléter le criblage de la librairie.

Détermination d'un modèle de la structure secondaire de l'ARN de la télomérase chez *Saccharomyces spp.*

Sur la base de leur parenté évolutionniste, nous avons sélectionné les souches de *Saccharomyces* du clan des « *Sensu stricto* » pour la détermination phylogénétique de la structure de TLC1 (Figure 17). Les séquences télomériques sont dictées par la matrice de la composante ARN de la télomérase. Des souches dont la séquence matricielle est identique, mais dont la séquence des répétitions télomériques diverge ont probablement des modes d'élongation des télomères différents (Cohn et al., 1998). Afin d'étudier la variabilité des séquences télomériques dans ce groupe de levures, nous avons digéré l'ADN génomique de *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. cariocanus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, *S. bayanus* et *S. pastorianus* avec l'enzyme *XhoI* seule ou avec une combinaison des enzymes *RsaI* et *HinfI*.

Chez *S. cerevisiae*, les éléments sous-télomériques Y' se retrouvent chez la plupart des télomères et contiennent un site pour l'enzyme de restriction *XhoI*, permettant de libérer un fragment terminal de restriction de ~1.3 kpb (voir Figure

1). L'analyse par Southern de l'ADN des « *Sensu stricto* » avec une sonde télomérique de *S. cerevisiae* montre une divergence dans la position du site *XhoI* le plus proximal des télomères. Cette divergence est due en partie au fait que les séquences Y' ne sont pas présentes chez tous les membres du groupe, notamment *S. mikatae* et *S. bayanus* (données non montrées). Chez *S. cerevisiae*, les répétitions télomériques sont irrégulières, probablement à cause du mode de réitération utilisé par TERT lors de l'élongation. On observe un bon niveau d'hybridation croisée entre *S. cerevisiae* et les autres « *Sensu stricto* », indiquant que la séquence de la matrice est conservée et/ou que les mécanismes d'addition des répétitions sont les mêmes au sein de ce groupe. La conservation de la séquence matricielle a été confirmée par l'analyse phylogénétique. La nécessité pour les protéines Rap1p et Cdc13p à s'associer aux séquences télomériques constitue probablement une forte pression de sélection en faveur de la conservation des séquences télomériques (Cohn et al., 1998).

À cause de la divergence dans la position du site *XhoI* proximal aux télomères, les tailles des séquences télomériques dans les souches « *Sensu stricto* » ne pouvaient être comparées. Cependant, du fait du court consensus de leurs sites de restriction, les endonucléases *RsaI* et *HinfI* se retrouvent très fréquemment au sein des séquences génomiques à l'exclusion de l'ADN télomérique. La digestion de l'ADN génomique par ces deux enzymes combinées permet, en principe, de libérer le plus petit fragment télomérique possible et facilite la comparaison de la taille des télomères d'une espèce à l'autre. L'analyse des TRFs des différentes souches permet de répartir les « *Sensu stricto* » en trois

classes par rapport à *S. cerevisiae*. Dans le premier groupe constitué de *S. paradoxus*, *S. cariocanus* et *S. kudriavzevii*, on retrouve celles dont la taille des TRFs est quasi-identique à celle de *S. cerevisiae*, soit environ 400 pb. Dans le second groupe comprenant *S. mikatae* et *S. bayanus*, les TRFs sont relativement longs à environ 1 kpb. Dans le dernier groupe comprenant *S. pastorianus*, les télomères sont plutôt courts à environ 200 pb. Cette variation de la longueur des TRFs est difficile à interpréter puisque l'homéostasie de la longueur des télomères est déterminée par un équilibre entre une multitude de facteurs. Cependant, les différences dans les propriétés enzymatiques de Est2p pourraient avoir une contribution importante.

Cette étude devrait avantageusement être complétée par un certain nombre d'expériences. Il serait notamment nécessaire de confirmer que les séquences détectées par hybridation sont effectivement des séquences terminales par digestion avec *Bal31*. Le séquençage des télomères chez les « *Sensu stricto* », de même que l'étude *in-vitro* de l'élongation des télomères dans ce groupe pourraient permettre de mieux comprendre les modalités d'addition des répétitions télomériques.

Dissection de la région promotrice de *TLC1* chez *Saccharomyces cerevisiae*

Au chapitre précédent, nous avons utilisé avec succès l'approche phylogénétique afin d'établir la structure secondaire de *TLC1*, l'ARN de la télomérase de la levure *S. cerevisiae*. Cette méthode nécessitait que nous obtenions un plus grand nombre de séquences homologues provenant d'espèces

apparentées dans le clan des « Ssensu stricto ». Ces séquences qui ont été obtenues grâce à l'amplification par PCR de la région intergénique de *PDX3* et *CSG2* (Dandjinou et al., 2004b), contiennent également les régions promotrices des homologues de *TLC1*. L'alignement des séquences immédiatement en amont de l'extrémité 5' mature des homologues de *TLC1* a révélé la présence d'éléments hautement conservés dont certains englobent des motifs caractéristiques du noyau promoteur de l'ARN polymérase II (Figure 19). Au contraire de la levure, la région promotrice des gènes encodant l'ARN de la télomérase des ciliés est relativement courte et contient des motifs caractéristiques de l'ARN polymérase III (Romero et Blackburn, 1991; Lingner et al., 1994).

Nous avons effectué des délétions sélectives de segments contenant ces régions conservées afin de mieux comprendre leur importance pour le maintien des télomères. Les résultats montrent que la région promotrice G à K (-299 à +1) est nécessaire et suffisante pour la survie des cellules (Tableau 7) et le maintien des télomères (Figure 21). Cette région proximale à *TLC1* contient probablement tous les éléments nécessaires à la production d'un ARN fonctionnel. Cette observation corrèle parfaitement avec la présence au sein de l'élément G à K des motifs du noyau promoteur, en l'occurrence deux boîtes TATA (machinerie transcriptionnelle), un putatif BRE (TFIIB), et un DPE (TFIID).

La dissection détaillée de la région proximale G à K montre que l'absence de l'élément I conduit à la sénescence. Cette observation est inattendue puisque la délétion complète de la région G à K, comprenant l'élément I, ne provoque pas la sénescence. Cette contradiction apparente s'explique essentiellement par la

nature des séquences promotrices mutantes et par leur proximité relativement aux séquences transcrites de *TLC1*. Lorsqu'elle est insérée directement en amont des séquences transcrites de *TLC1*, la région distale A à F peut soutenir la survie des cellules et stabiliser les télomères, bien qu'à une longueur inférieure à la souche de type sauvage. La région A à F contient vraisemblablement les séquences promotrices de *PDX3* (Loubbardi et al., 1995) et pourrait transcrire à rebours le gène *TLC1* lorsqu'il est placé à proximité, comme c'est le cas suite à la délétion du segment G à K. Cette transcription cryptique est supportée par nos observations selon lesquelles *TLC1* est efficacement transcrit (en quantité et en qualité) à partir de séquences situées en amont du site de clonage multiple du plasmide pRS316 (données non montrées). Lorsque le segment I est délété individuellement de la région promotrice, les éléments promoteurs contenus dans la région A à F semblent de toute évidence trop éloignés des séquences codantes de *TLC1* pour assurer une transcription efficace. Cette situation se traduit par l'apparition de la sénescence et indique que les séquences I ont un rôle déterminant pour le déroulement d'une ou plusieurs étapes de la biogénèse de *TLC1*. L'importance du segment I dans la transcription de *TLC1* pourrait être étayée par sa localisation au sein du promoteur. Le motif I est situé à environ -240 à -300 pb du 5' mature de *TLC1*, entre le putatif site de liaison de TFIID (DPE) et les hypothétiques boîtes TATA. Cette position correspond grosso-modo au site d'initiation de la transcription (voir Smale et Kadonaga, 2003). Le DPE sert de site de liaison à TFIID et fonctionne en coordination avec les séquences du site d'initiation de la transcription (Burke et Kadonaga, 1996; Burke et Kadonaga, 1997; Zhou et

Chiang, 2001). Il faut noter que le DPE a été caractérisé chez *Drosophila melanogaster* et *Homo sapiens*, mais sa présence chez la levure n'a pas encore été confirmée. Alternativement à ce rôle direct dans la transcription de *TLC1*, la région I pourrait faire partie d'un transcrit *TLC1* primaire non mûré, et se replier en une structure secondaire indispensable à la maturation, la stabilisation ou l'assemblage de l'ARN mûre. Cette hypothèse est soutenue par la comparaison phylogénétique du motif I dans le groupe des « Ssensu stricto » (données non montrées). Une structure hélicale formée par l'élément I comporte de nombreux cas de covariations, ce qui supporte sa présence. Si cette hypothèse structurale s'avère, l'absence de l'élément I devrait affecter les étapes de la biogénèse de *TLC1* en aval de sa transcription.

Dans le cadre de cette étude, Stéphanie Larose a effectué l'analyse par transfert Northern des transcrits de *TLC1* provenant des souches transformées avec les différents plasmides mentionnés plus haut. Les données recueillies montrent que la région promotrice A à F produit en majorité la forme poly A⁺ de *TLC1*, alors que la région promotrice G à K permet essentiellement la transcription de la forme poly A⁻. Ces données suggèrent que la forme poly A⁻ est suffisante pour le maintien adéquat des télomères. De plus, le fait que la forme poly A⁻ soit d'une part en mesure de soutenir efficacement le maintien des télomères et d'autre part retrouvée au sein du complexe RNP (Bosoy et al., 2003) renforce l'idée selon laquelle cette forme poly A⁻ est bien la forme active de *TLC1*. Les analyses par Northern réalisées par Stéphanie montrent qu'en l'absence de la région I, *TLC1* n'est pas produit à des niveaux détectables.

Des délétions progressives des régions distales en amont de *TLC1* sont nécessaires pour circonscrire les limites du promoteur. De plus, des mutations ponctuelles et des essais biochimiques seront utiles afin de mieux caractériser les motifs retrouvés au sein de ce promoteur. Puisque l'homologue de *TLC1* chez *S. bayanus* est le seul de tout le groupe des « Senu stricto » à ne pas compléter la délétion de *TLC1* chez *S. cerevisiae*, il serait intéressant d'effectuer des échanges de promoteur afin de déterminer si des variations dans les séquences promotrices pourraient être en cause.

Étude des interactions régissant la formation du putatif pseudonoeud I dans l'ARN de la télomérase chez *Saccharomyces cerevisiae*

L'ARN de la télomérase des ciliés, des vertébrés et de la levure *K. lactis* comporte une structure en pseudonoeud essentielle à l'association de la transcriptase inverse et à l'activité enzymatique. La détermination de la structure secondaire de l'ARN de la télomérase chez la levure *S. cerevisiae* au chapitre III nous a permis de proposer la présence d'un élément structural similaire (Dandjinou et al., 2004b). La possibilité d'un pseudonoeud au sein de *TLC1* est renforcée par le fait que sa position coïncide avec une région nécessaire à l'association de Est2p (Livengood et al., 2002). De plus, les séquences impliquées dans cet appariement sont très conservées au sein du groupe des « Senu stricto », suggérant que la structure tri-dimensionnelle adoptée par cette région est un déterminant essentiel à l'association et la fonction de la télomérase. Chez *S. cerevisiae*, le pseudonoeud serait formé par l'appariement de séquences

complémentaires dans les boucles des hélices V et VI. Dans la présente étude, nous avons tenté de confirmer la nécessité de l'appariement des séquences complémentaires des boucles des hélices V et VI pour la formation du pseudonoeud et la fonction de la télomérase *in-vivo*. Si cet appariement est essentiel, son altération devrait déstabiliser le pseudonoeud et aurait du avoir des effets notables sur la survie des cellules et la longueur des télomères. Les tests de complémentation indiquent cependant que l'appariement de ces deux segments complémentaires n'est pas essentiel à la survie des cellules au bout de 100 générations. Ce résultat peut simplement s'expliquer par le fait que chez *S. cerevisiae*, au contraire des ciliés, des vertébrés et de *K. lactis*, la formation du pseudonoeud n'est pas essentielle à l'association de TERT. Il se peut également que des interactions additionnelles soient impliquées dans la formation de l'interaction tertiaire. À cet égard, la présence élevée de résidus A et U dans le domaine pseudonoeud pourrait faciliter l'utilisation de séquences alternatives pour maintenir la structure. Si cette dernière possibilité s'avère, l'analyse de la longueur des télomères devrait montrer un raccourcissement puis une stabilisation des TRFs. L'homologue de *TLC1* chez *S. bayanus* est le seul de tout le groupe des « Ssensu stricto » à ne pas compléter la délétion de *TLC1* chez *S. cerevisiae*. L'une des différences structurales entre l'ARN de *S. bayanus* et celui de *S. cerevisiae* réside dans la nature des nucléotides impliqués dans la formation du putatif pseudonoeud (Dandjinou et al., 2004b). Nous avons voulu vérifier si l'incapacité de l'ARN de *S. bayanus* à remplacer *TLC1* pouvait être reproduit en substituant les interactions du pseudonoeud de *S. cerevisiae* par celles de *S.*

bayanus. Les tests de complémentation montrent que la différence des résidus possiblement impliqués dans la formation du pseudonoeud n'est pas la cause de la sénescence. L'incapacité de l'ARN de *S. bayanus* à remplacer TLC1 pourrait provenir des autres différences structurales observées entre les ARNs de *S. bayanus* et *S. cerevisiae*. Il est aussi possible que les machineries impliquées dans la biogénèse de l'ARN chez les deux espèces aient divergé au point de devenir incompatibles. Cette incompatibilité se traduit par un défaut de la production et/ou la stabilité de l'ARN de *S. bayanus* chez *S. cerevisiae*.

Pendant que cette étude était en cours, le groupe de Lundblad (Chappell et Lundblad, 2004) a utilisé des constructions chimériques où le putatif pseudonoeud de TLC1 a été substitué par divers pseudonoeuds dont la structure a été précédemment caractérisée. Ces études de chimères montrent que la présence d'une structure tertiaire en pseudonoeud contribue au maintien des télomères. Cependant, ces expériences n'établissent pas de façon formelle qu'un pseudonoeud est présent chez *S. cerevisiae* et n'identifient pas les séquences qui y contribuent.

Ce projet pourrait être complété par des constructions dans lesquelles (1) les nucléotides du pseudonoeud seront altérés de manière à l'interrompre, (2) les nucléotides avoisinants seront changés de façon à limiter les possibilités d'appariements cryptiques. L'altération de l'appariement présumé sera corrélée avec la perte de viabilité et/ou le raccourcissement des télomères. De plus, la capacité de Est2p à s'associer à cette structure pourrait également être testée par immuno-précipitation.

CONCLUSIONS

Mes différents projets doctoraux m'ont permis d'aborder divers aspects de la biologie des télomères.

La réplication des extrémités télomériques chez *S. cerevisiae* se produit grâce à la collaboration entre la machinerie de réplication conventionnelle et l'activité d'une polymérase spécialisée, la télomérase. Le gène *CDC13* joue un rôle crucial dans la réplication des télomères en coordonnant ces deux processus. Une variété de phénotypes sont associés aux mutants de *CDC13*, indiquant la diversité des fonctions de ce gène. Nous avons montré que le mutant *cdc13-2* ne contribue pas de façon notable à l'initiation de la réplication aux télomères. Si cette initiation aberrante s'était confirmée, elle aurait précisé le rôle de *CDC13* dans la coordination de la réplication. Néanmoins de nombreuses facettes du rôle de *CDC13* restent à découvrir.

Lorsque l'activité télomérase est abolie dans une souche de *S. cerevisiae* en culture, une fraction de la population arrive à survivre en utilisant la recombinaison homologue. Ces survivants sont passés par une phase de sénescence au cours de laquelle la recombinaison homologue prend progressivement la relève de la télomérase. Lorsque cette voie est également inactivée, aucun survivant n'émerge, indiquant que si des mécanismes additionnels de survie existent, ils sont très peu efficaces. Nous avons tenté de mettre en évidence de nouvelles voies de survie dans un contexte de surexpression. Nous avons montré que la phase de sénescence est complètement évitée lorsque certains facteurs comme

Net1p sont surexprimés chez les survivants. Cependant, ces survivants ont besoin de la recombinaison homologe. Ces données indiquent que la recombinaison homologe, et possiblement d'autres mécanismes encore inconnus peuvent être facilités en altérant le contexte physiologique (Lowell et al., 2003).

En plus de sa participation à l'assemblage de la RNP télomérase, TLC1 joue un rôle crucial dans la catalyse de l'addition des nucléotides aux télomères. L'établissement d'un modèle de la structure secondaire de TLC1 constitue une étape déterminante dans la compréhension de la biogénèse et de la fonction de la télomérase. L'organisation des éléments structuraux au sein de TLC1 permet de proposer un modèle spéculatif du recrutement de la télomérase aux télomères (Figure 23). L'extrémité simple brin générée suite à la réplication du brin retardé et à la résection du brin avancé permet l'association de Cdc13p (Lin et Zakian, 1996; Nugent et al., 1996; Hughes et al., 2000b). Est2p, la sous-unité catalytique de la télomérase, est associée au noyau central de TLC1 (partie terminale de l'hélice I, partie initiale de l'hélice IIa matérialisée par la limite matricielle, matrice, hélice III, hélices V et VI). La présence constitutive ou transitoire de la télomérase aux télomères est vraisemblablement facilitée par l'interaction entre l'hélice IIc de TLC1 et le complexe Yku (Gravel et al., 1998; Stellwagen et al., 2003; Figure 23A). Aucune interaction directe entre Cdc13p et la télomérase n'a été mise en évidence, indiquant la nécessité d'un intermédiaire. Ce rôle de médiateur est joué par Est1p, une protéine capable de s'associer à la fois avec l'hélice IVc de TLC1 et Cdc13p (Zhou et al., 2000; Qi et Zakian, 2000; Livengood et al., 2002; Seto et al., 2002; Figure 23B). L'association de Est1p aux télomères se produit probablement

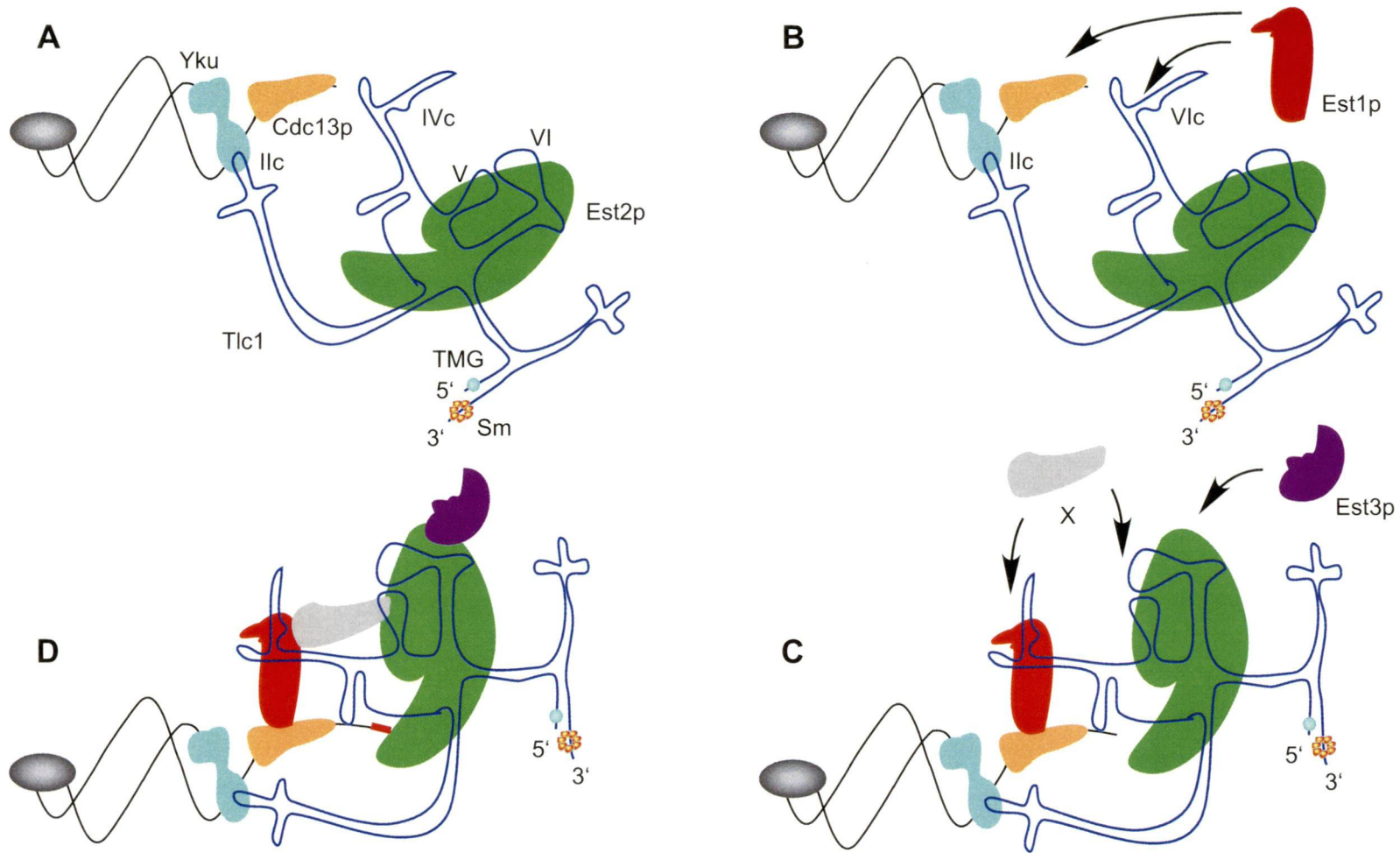


Figure 23. Contribution de TLC1 à l'assemblage, au recrutement et à l'activité de la télomérase. (A) Est2p est associée au noyau catalytique de TLC1. L'interaction de TLC1 (hélice IIc) avec Yku facilite la localisation de la télomérase aux télomères; (B) Est1p sert de lien entre TLC1 (hélice III) et Cdc13p; (C) Est1p facilite le repositionnement de la télomérase et l'activation de Est2p. L'association de Est3p à Est2p, de même que le recrutement de facteurs additionnels (X) contribuent probablement à l'assemblage et à la régulation de la télomérase; (D) La matrice de TLC1 sert à dicter la séquence des répétitions incorporées au cours la transcription inverse (ligne rouge). Voir le texte pour une description plus détaillée.

en fin de phase S, au moment où son expression est maximale (Taggart et al., 2002). Le fait que Est1p possède également une certaine affinité pour le simple brin télomérique (Steiner et al., 1996; Virta-Pearlman et al., 1996; Zhou et al., 2000) pourrait signifier que sa présence aux télomères résulte d'un processus en deux étapes. Est1p pourrait d'abord s'associer directement à l'extension télomérique, puis être repositionnée sur Cdc13p. L'association de Est1p, à la fois à Cdc13p et à l'hélice IVc de TLC1 pourrait induire des changements conformationnels favorables à l'activation de Est2p (Figure 23C). Des facteurs additionnels comme des chaperones pourraient contribuer à l'assemblage du complexe actif. L'association de Est3p à Est2p permettrait de réguler l'activité de la télomérase. Une fois activée, la télomérase initie l'incorporation des nucléotides à l'extrémité 3' du brin G-riche, tel que dicté par sa matrice (jonction IIa/III) et dans les limites imposées par la frontière matricielle (Figure 23D).

La biogénèse de TLC1 est encore mal comprise. Nous avons entrepris l'analyse des séquences promotrices juxtaposées à la région 5' correspondant au transcrit mature de TLC1. Les données recueillies indiquent que les 300 nucléotides situés en amont des séquences de *TLC1* sont nécessaires et suffisants pour produire un ARN fonctionnel. Cette région contient des motifs caractéristiques de l'ARN polymérase II. La délétion de la région I, contenant un de ces motifs, abolit complètement l'activité télomérase. Ces données préliminaires devraient contribuer à mieux comprendre les processus de maturation de TLC1.

La présence d'un pseudonoeud dans l'ARN de la télomérase apparaît essentielle pour l'activité catalytique de l'enzyme. Nous avons tenté de confirmer

génétiqnement l'existence chez *S. cerevisiae* d'un pseudonoeud suggéré par l'analyse phylogénétique. Les données préliminaires indiquent que la formation de cette structure est soit superflue, assez flexible pour adopter des conformations alternatives ou beaucoup plus complexe qu'initialement envisagé. Afin de discriminer ces deux possibilités, des analyses génétiques (introduction de mutations en dehors du putatif pseudonoeud) additionnelles devront être couplées à des études biochimiques (cartographie de la structure des mutants).

REMERCIEMENTS

Ma gratitude va en premier au Dr. Raymund Wellinger pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et offert l'opportunité de travailler sur un projet intellectuellement stimulant.

J'aimerais exprimer ma reconnaissance au Dr. Schérif Abou Elela pour son intarissable enthousiasme, son imagination débordante, son expertise professionnelle et sa générosité humaine.

Mes remerciements vont également au Dr. Joachim Lingner, au Dr. Simon Labbé et au Dr. Claudine Rancourt, non seulement pour avoir accepté de siéger sur mon jury de thèse, mais aussi pour avoir contribué à en relever la qualité par leurs commentaires.

Je suis redevable envers le Dr. Julie Parenteau et Nancy Lévesque pour avoir si généreusement consacré une partie de leur temps à la révision de ce manuscrit.

J'aimerais finalement remercier mes collègues et amis du laboratoire et du département dont la contribution intellectuelle et matérielle, ainsi que le constant soutien moral ont facilité le franchissement de cette étape.

RÉFÉRENCES

- Adams Martin, A., I. Dionne, R.J. Wellinger, and C. Holm. 2000. The function of DNA polymerase alpha at telomeric G tails is important for telomere homeostasis. *Molecular & Cellular Biology* **20**: 786-96.
- Adams, S.P., T.P. Hartman, K.Y. Lim, M.W. Chase, M.D. Bennett, I.J. Leitch, and A.R. Leitch. 2001. Loss and recovery of Arabidopsis-type telomere repeat sequences 5'-(TTTAGGG)(n)-3' in the evolution of a major radiation of flowering plants. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **268**: 1541-6.
- Adkins, N.L., M. Watts, and P.T. Georgel. 2004. To the 30-nm chromatin fiber and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta* **1677**: 12-23.
- Ammerer, G. 1983. Expression of genes in yeast using the ADCl promoter. *Methods in Enzymology* **101**: 192-201.
- Ancelin, K., C. Brun, and E. Gilson. 1998. Role of the telomeric DNA-binding protein TRF2 in the stability of human chromosome ends. *Bioessays* **20**: 879-83.
- Antal, M., E. Boros, F. Solymosy, and T. Kiss. 2002. Analysis of the structure of human telomerase RNA in vivo. *Nucleic Acids Research* **30**: 912-20.
- Aparicio, O.M., B.L. Billington, and D.E. Gottschling. 1991. Modifiers of position effect are shared between telomeric and silent mating-type loci in *S. cerevisiae*. *Cell* **66**: 1279-87.
- Arai, K., K. Masutomi, S. Khurts, S. Kaneko, K. Kobayashi, and S. Murakami. 2002. Two independent regions of human telomerase reverse transcriptase are important for its oligomerization and telomerase activity. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 8538-44. Epub 2001 Dec 18.
- Autexier, C. and C.W. Greider. 1998. Mutational analysis of the Tetrahymena telomerase RNA: identification of residues affecting telomerase activity in vitro. *Nucleic Acids Research* **26**: 787-95.
- Autexier, C., R. Pruzan, W.D. Funk, and C.W. Greider. 1996. Reconstitution of human telomerase activity and identification of a minimal functional region of the human telomerase RNA. *EMBO Journal* **15**: 5928-35.
- Autexier, C. and I. Triki. 1999. Tetrahymena telomerase ribonucleoprotein RNA-protein interactions. *Nucleic Acids Research* **27**: 2227-34.
- Bachand, F., I. Triki, and C. Autexier. 2001. Human telomerase RNA-protein interactions. *Nucleic Acids Research* **29**: 3385-93.

- Bailey, S.M., M.A. Brennenman, and E.H. Goodwin. 2004a. Frequent recombination in telomeric DNA may extend the proliferative life of telomerase-negative cells. *Nucleic Acids Research* **32**: 3743-51.
- Bailey, S.M., M.N. Cornforth, A. Kurimasa, D.J. Chen, and E.H. Goodwin. 2001. Strand-specific postreplicative processing of mammalian telomeres. *Science* **293**: 2462-5.
- Bailey, S.M., M.N. Cornforth, R.L. Ullrich, and E.H. Goodwin. 2004b. Dysfunctional mammalian telomeres join with DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)* **3**: 349-57.
- Bailey, S.M., J. Meyne, D.J. Chen, A. Kurimasa, G.C. Li, B.E. Lehnert, and E.H. Goodwin. 1999. DNA double-strand break repair proteins are required to cap the ends of mammalian chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 14899-904.
- Basehoar, A.D., S.J. Zanton, and B.F. Pugh. 2004. Identification and distinct regulation of yeast TATA box-containing genes. *Cell* **116**: 699-709.
- Baumann, P. and T.R. Cech. 2001. Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science* **292**: 1171-5.
- Beattie, T.L., W. Zhou, M.O. Robinson, and L. Harrington. 2000. Polymerization defects within human telomerase are distinct from telomerase RNA and TEP1 binding. *Molecular Biology of the Cell* **11**: 3329-40.
- . 2001. Functional multimerization of the human telomerase reverse transcriptase. *Molecular & Cellular Biology* **21**: 6151-60.
- Beeler, T., K. Gable, C. Zhao, and T. Dunn. 1994. A novel protein, CSG2p, is required for Ca²⁺ regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 7279-84.
- Beernink, H.T., K. Miller, A. Deshpande, P. Bucher, and J.P. Cooper. 2003. Telomere maintenance in fission yeast requires an Est1 ortholog. *Current Biology* **13**: 575-80.
- Benoist, C. and P. Chambon. 1981. In vivo sequence requirements of the SV40 early promoter region. *Nature* **290**: 304-10.
- Bertuch, A.A. and V. Lundblad. 2004. EXO1 contributes to telomere maintenance in both telomerase-proficient and telomerase-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **166**: 1651-9.
- Bianchi, A., R.M. Stansel, L. Fairall, J.D. Griffith, D. Rhodes, and T. de Lange. 1999. TRF1 binds a bipartite telomeric site with extreme spatial flexibility. *Embo Journal* **18**: 5735-44.

- Biessmann, H., M.F. Walter, and J.M. Mason. 1997. *Drosophila* telomere elongation. *Ciba Found Symp* **211**: 53-67; discussion 67-70.
- Bilaud, T., C. Brun, K. Ancelin, C.E. Koering, T. Laroche, and E. Gilson. 1997. Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nature Genetics* **17**: 236-9.
- Bilaud, T., C.E. Koering, E. Binet-Brasselet, K. Ancelin, A. Pollice, S.M. Gasser, and E. Gilson. 1996. The telobox, a Myb-related telomeric DNA binding motif found in proteins from yeast, plants and human. *Nucleic Acids Research* **24**: 1294-303.
- Blackburn, E.H. and S.S. Chiou. 1981. Non-nucleosomal packaging of a tandemly repeated DNA sequence at termini of extrachromosomal DNA coding for rRNA in *Tetrahymena*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**: 2263-7.
- Blackburn, E.H. and J.G. Gall. 1978. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *Journal of Molecular Biology* **120**: 33-53.
- Blasco, M.A., W. Funk, B. Villeponteau, and C.W. Greider. 1995. Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA. *Science* **269**: 1267-70.
- Blasco, M.A., H.W. Lee, M.P. Hande, E. Samper, P.M. Lansdorp, R.A. DePinho, and C.W. Greider. 1997a. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* **91**: 25-34.
- . 1997b. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* **91**: 25-34.
- Bodnar, A.G., M. Ouellette, M. Frolkis, S.E. Holt, C.P. Chiu, G.B. Morin, C.B. Harley, J.W. Shay, S. Lichtsteiner, and W.E. Wright. 1998. Extension of lifespan by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**: 349-52.
- Boeke, J.D., J. Trueheart, G. Natsoulis, and G.R. Fink. 1987. 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods in Enzymology* **154**: 164-75.
- Bosoy, D. and N.F. Lue. 2004. Yeast telomerase is capable of limited repeat addition processivity. *Nucleic Acids Research* **32**: 93-101.
- Bosoy, D., Y. Peng, I.S. Mian, and N.F. Lue. 2003. Conserved N-terminal motifs of telomerase reverse transcriptase required for ribonucleoprotein assembly in vivo. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 3882-90.

- Botstein, D., S.C. Falco, S.E. Stewart, M. Brennan, S. Scherer, D.T. Stinchcomb, K. Struhl, and R.W. Davis. 1979. Sterile host yeasts (SHY): a eukaryotic system of biological containment for recombinant DNA experiments. *Gene* **8**: 17-24.
- Branlant, C., A. Krol, J.P. Ebel, E. Lazar, B. Haendler, and M. Jacob. 1982. U2 RNA shares a structural domain with U1, U4, and U5 RNAs. *Embo Journal* **1**: 1259-65.
- Braunstein, M., A.B. Rose, S.G. Holmes, C.D. Allis, and J.R. Broach. 1993. Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation. *Genes & Development* **7**: 592-604.
- Broccoli, D., A. Smogorzewska, L. Chong, and T. de Lange. 1997. Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nature Genetics* **17**: 231-5.
- Brunel, C. and P. Romby. 2000. Probing RNA structure and RNA-ligand complexes with chemical probes. *Methods in Enzymology* **318**: 3-21.
- Buchman, A.R., W.J. Kimmerly, J. Rine, and R.D. Kornberg. 1988. Two DNA-binding factors recognize specific sequences at silencers, upstream activating sequences, autonomously replicating sequences, and telomeres in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & Cellular Biology* **8**: 210-25.
- Budarf, M.L. and E.H. Blackburn. 1986. Chromatin structure of the telomeric region and 3'-nontranscribed spacer of *Tetrahymena* ribosomal RNA genes. *Journal of Biological Chemistry* **261**: 363-9.
- Burke, T.W. and J.T. Kadonaga. 1996. *Drosophila* TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes & Development* **10**: 711-24.
- . 1997. The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAFII60 of *Drosophila*. *Genes & Development* **11**: 3020-31.
- Carlson, M. and D. Botstein. 1982. Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted with intracellular forms of yeast invertase. *Cell* **28**: 145-54.
- Chan, C.S. and B.K. Tye. 1983. Organization of DNA sequences and replication origins at yeast telomeres. *Cell* **33**: 563-73.
- Chandra, A., T.R. Hughes, C.I. Nugent, and V. Lundblad. 2001. Cdc13 both positively and negatively regulates telomere replication. *Genes & Development* **15**: 404-14.

- Chapon, C., A.J. Zaug, and T.R. Cech. 1997. Polyadenylation of telomerase RNA in budding yeast. *Rna* **3**: 1337-51.
- Chappell, A.S. and V. Lundblad. 2004. Structural elements required for association of the *Saccharomyces cerevisiae* telomerase RNA with the Est2 reverse transcriptase. *Molecular & Cellular Biology* **24**: 7720-36.
- Chen, J.L., M.A. Blasco, and C.W. Greider. 2000. Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell* **100**: 503-14.
- Chen, J.L., K.K. Opperman, and C.W. Greider. 2002. A critical stem-loop structure in the CR4-CR5 domain of mammalian telomerase RNA. *Nucleic Acids Research* **30**: 592-7.
- Chen, Q., A. Ijima, and C.W. Greider. 2001. Two survivor pathways that allow growth in the absence of telomerase are generated by distinct telomere recombination events. *Molecular & Cellular Biology* **21**: 1819-27.
- Chong, L., B. van Steensel, D. Broccoli, H. Erdjument-Bromage, J. Hanish, P. Tempst, and T. de Lange. 1995. A human telomeric protein. *Science* **270**: 1663-7.
- Cockell, M.M. and S.M. Gasser. 1999. The nucleolus: nucleolar space for RENT. *Current Biology* **9**: R575-6.
- Cohn, M. and E.H. Blackburn. 1995. Telomerase in yeast. *Science* **269**: 396-400.
- Cohn, M., M.J. McEachern, and E.H. Blackburn. 1998. Telomeric sequence diversity within the genus *Saccharomyces*. *Current Genetics* **33**: 83-91.
- Colgin, L.M., K. Baran, P. Baumann, T.R. Cech, and R.R. Reddel. 2003. Human POT1 facilitates telomere elongation by telomerase. *Current Biology* **13**: 942-6.
- Collins, K. and C.W. Greider. 1993. Tetrahymena telomerase catalyzes nucleolytic cleavage and nonprocessive elongation. *Genes & Development* **7**: 1364-76.
- Cong, Y.S., W.E. Wright, and J.W. Shay. 2002. Human telomerase and its regulation. *Microbiology & Molecular Biology Reviews* **66**: 407-25.
- Conrad, M.N., J.H. Wright, A.J. Wolf, and V.A. Zakian. 1990. RAP1 protein interacts with yeast telomeres in vivo: overproduction alters telomere structure and decreases chromosome stability. *Cell* **63**: 739-50.
- Counter, C.M., M. Meyerson, E.N. Eaton, and R.A. Weinberg. 1997. The catalytic subunit of yeast telomerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 9202-7.

- Dandjinou, A.T., I. Dionne, S. Gravel, C. LeBel, J. Parenteau, and R.J. Wellinger. 1999. Cytological and functional aspects of telomere maintenance. *Histology & Histopathology* **14**: 517-24.
- Dandjinou, A.T., M. Larrivée, R.E. Wellinger, and R.J. Wellinger. 2004a. Two-dimensional agarose-gel analysis of DNA replication intermediates. *Methods in Molecular Biology* **In press**.
- Dandjinou, A.T., N. Levesque, S. Larose, J.F. Lucier, S. Abou Elela, and R.J. Wellinger. 2004b. A phylogenetically based secondary structure for the yeast telomerase RNA. *Current Biology* **14**: 1148-58.
- de Bruin, D., S.M. Kantrow, R.A. Liberatore, and V.A. Zakian. 2000a. Telomere folding is required for the stable maintenance of telomere position effects in yeast. *Molecular & Cellular Biology* **20**: 7991-8000.
- . 2000b. Telomere folding is required for the stable maintenance of telomere position effects in yeast. *Molecular & Cellular Biology* **20**: 7991-8000.
- de Bruin, D., Z. Zaman, R.A. Liberatore, and M. Ptashne. 2001. Telomere looping permits gene activation by a downstream UAS in yeast. *Nature* **409**: 109-13.
- Defossez, P.A., R. Prusty, M. Kaeberlein, S.J. Lin, P. Ferrigno, P.A. Silver, R.L. Keil, and L. Guarente. 1999. Elimination of replication block protein Fob1 extends the life span of yeast mother cells. *Molecular Cell* **3**: 447-55.
- Diede, S.J. and D.E. Gottschling. 2001. Exonuclease activity is required for sequence addition and Cdc13p loading at a de novo telomere. *Current Biology* **11**: 1336-40.
- Dionne, I. and R.J. Wellinger. 1998. Processing of telomeric DNA ends requires the passage of a replication fork. *Nucleic Acids Research* **26**: 5365-71.
- Dragon, F., V. Pogacic, and W. Filipowicz. 2000. In vitro assembly of human H/ACA small nucleolar RNPs reveals unique features of U17 and telomerase RNAs. *Molecular & Cellular Biology* **20**: 3037-48.
- Ducrest, A.L., H. Szutorisz, J. Lingner, and M. Nabholz. 2002. Regulation of the human telomerase reverse transcriptase gene. *Oncogene* **21**: 541-52.
- Dunham, M.A., A.A. Neumann, C.L. Fasching, and R.R. Reddel. 2000. Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nature Genetics* **26**: 447-50.
- Dynek, J.N. and S. Smith. 2004. Resolution of sister telomere association is required for progression through mitosis. *Science* **304**: 97-100.
- Eickbush, T.H. 1997. Telomerase and retrotransposons: which came first? *Science* **277**: 911-2.

- Emili, A. 1998. MEC1-dependent phosphorylation of Rad9p in response to DNA damage. *Molecular Cell* **2**: 183-9.
- Espejel, S. and M.A. Blasco. 2002. Identification of telomere-dependent "senescence-like" arrest in mouse embryonic fibroblasts. *Experimental Cell Research* **276**: 242-8.
- Evans, S.K. and V. Lundblad. 1999. Est1 and Cdc13 as comediators of telomerase access. *Science* **286**: 117-20.
- . 2002. The Est1 subunit of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase makes multiple contributions to telomere length maintenance. *Genetics* **162**: 1101-15.
- Feng, J., W.D. Funk, S.S. Wang, S.L. Weinrich, A.A. Avilion, C.P. Chiu, R.R. Adams, E. Chang, R.C. Allsopp, J. Yu, S. Le, M.D. West, C.B. Harley, W.H. Andrews, C.W. Greider, and B. Villerponteau. 1995. The RNA component of human telomerase. *Science* **269**: 1236-41.
- Ferrezuelo, F., B. Steiner, M. Aldea, and B. Fitcher. 2002. Biogenesis of yeast telomerase depends on the importin mtr10. *Molecular & Cellular Biology* **22**: 6046-55.
- Fiset, S. and B. Chabot. 2001. hnRNP A1 may interact simultaneously with telomeric DNA and the human telomerase RNA in vitro. *Nucleic Acids Research* **29**: 2268-75.
- Fitzgerald, M.S., T.D. McKnight, and D.E. Shippen. 1996. Characterization and developmental patterns of telomerase expression in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 14422-7.
- Ford, L.P., J.W. Shay, and W.E. Wright. 2001. The La antigen associates with the human telomerase ribonucleoprotein and influences telomere length in vivo. *Rna* **7**: 1068-75.
- Ford, L.P., J.M. Suh, W.E. Wright, and J.W. Shay. 2000. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1 and C2 associate with the RNA component of human telomerase. *Molecular & Cellular Biology* **20**: 9084-91.
- Forstemann, K., M. Hoss, and J. Lingner. 2000. Telomerase-dependent repeat divergence at the 3' ends of yeast telomeres. *Nucleic Acids Research* **28**: 2690-4.
- Forstemann, K. and J. Lingner. 2001. Molecular basis for telomere repeat divergence in budding yeast. *Molecular & Cellular Biology* **21**: 7277-86.

- Friedman, K.L. and T.R. Cech. 1999. Essential functions of amino-terminal domains in the yeast telomerase catalytic subunit revealed by selection for viable mutants. *Genes & Development* **13**: 2863-74.
- Friedman, K.L., J.J. Heit, D.M. Long, and T.R. Cech. 2003. N-terminal domain of yeast telomerase reverse transcriptase: recruitment of Est3p to the telomerase complex. *Molecular Biology of the Cell* **14**: 1-13.
- Frydrychova, R. and F. Marec. 2002. Repeated losses of TTAGG telomere repeats in evolution of beetles (Coleoptera). *Genetica* **115**: 179-87.
- Galy, V., J.C. Olivo-Marin, H. Scherthan, V. Doye, N. Rascalou, and U. Nehrbass. 2000. Nuclear pore complexes in the organization of silent telomeric chromatin. *Nature* **403**: 108-12.
- Gandhi, L. and K. Collins. 1998. Interaction of recombinant Tetrahymena telomerase proteins p80 and p95 with telomerase RNA and telomeric DNA substrates. *Genes & Development* **12**: 721-33.
- Garvik, B., M. Carson, and L. Hartwell. 1995. Single-stranded DNA arising at telomeres in cdc13 mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint. *Molecular & Cellular Biology* **15**: 6128-38.
- Gietz, R.D., R.H. Schiestl, A.R. Willems, and R.A. Woods. 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**: 355-60.
- Gilley, D. and E.H. Blackburn. 1999. The telomerase RNA pseudoknot is critical for the stable assembly of a catalytically active ribonucleoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 6621-5.
- Gotta, M. and S.M. Gasser. 1996. Nuclear organization and transcriptional silencing in yeast. *Experientia* **52**: 1136-47.
- Gotta, M., S. Strahl-Bolsinger, H. Renauld, T. Laroche, B.K. Kennedy, M. Grunstein, and S.M. Gasser. 1997. Localization of Sir2p: the nucleolus as a compartment for silent information regulators. *Embo Journal* **16**: 3243-55.
- Gottlieb, S. and R.E. Esposito. 1989. A new role for a yeast transcriptional silencer gene, SIR2, in regulation of recombination in ribosomal DNA. *Cell* **56**: 771-6.
- Gottschling, D.E., O.M. Aparicio, B.L. Billington, and V.A. Zakian. 1990. Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell* **63**: 751-62.

- Gottschling, D.E. and T.R. Cech. 1984. Chromatin structure of the molecular ends of *Oxytricha* macronuclear DNA: phased nucleosomes and a telomeric complex. *Cell* **38**: 501-10.
- Grandin, N., C. Damon, and M. Charbonneau. 2000. Cdc13 cooperates with the yeast Ku proteins and Stn1 to regulate telomerase recruitment. *Molecular & Cellular Biology* **20**: 8397-408.
- . 2001a. Cdc13 prevents telomere uncapping and Rad50-dependent homologous recombination. *EMBO Journal* **20**: 6127-39.
- . 2001b. Ten1 functions in telomere end protection and length regulation in association with Stn1 and Cdc13. *Embo Journal* **20**: 1173-83.
- Grandin, N., S.I. Reed, and M. Charbonneau. 1997. Stn1, a new *Saccharomyces cerevisiae* protein, is implicated in telomere size regulation in association with Cdc13. *Genes & Development* **11**: 512-27.
- Gravel, S., M. Larrivée, P. Labrecque, and R.J. Wellinger. 1998. Yeast Ku as a regulator of chromosomal DNA end structure. *Science* **280**: 741-4.
- Greider, C.W. 1991. Telomerase is processive. *Molecular & Cellular Biology* **11**: 4572-80.
- Greider, C.W. and E.H. Blackburn. 1985. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* **43**: 405-13.
- . 1987. The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* **51**: 887-98.
- . 1989. A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* **337**: 331-7.
- Griffith, J., A. Bianchi, and T. de Lange. 1998. TRF1 promotes parallel pairing of telomeric tracts in vitro. *Journal of Molecular Biology* **278**: 79-88.
- Griffith, J.D., L. Comeau, S. Rosenfield, R.M. Stansel, A. Bianchi, H. Moss, and T. de Lange. 1999. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* **97**: 503-14.
- Guiducci, C., M.A. Cerone, and S. Bacchetti. 2001. Expression of mutant telomerase in immortal telomerase-negative human cells results in cell cycle deregulation, nuclear and chromosomal abnormalities and rapid loss of viability. *Oncogene* **20**: 714-25.
- Haber, J.E. 1999. DNA repair. Gatekeepers of recombination. *Nature* **398**: 665, 667.

- Hackett, J.A., D.M. Feldser, and C.W. Greider. 2001. Telomere dysfunction increases mutation rate and genomic instability. *Cell* **106**: 275-86.
- Hahn, W.C., C.M. Counter, A.S. Lundberg, R.L. Beijersbergen, M.W. Brooks, and R.A. Weinberg. 1999. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* **400**: 464-8.
- Hahn, W.C., S.K. Dessain, M.W. Brooks, J.E. King, B. Elenbaas, D.M. Sabatini, J.A. DeCaprio, and R.A. Weinberg. 2002. Enumeration of the simian virus 40 early region elements necessary for human cell transformation. *Molecular & Cellular Biology* **22**: 2111-23.
- Hardy, C.F., L. Sussel, and D. Shore. 1992. A RAP1-interacting protein involved in transcriptional silencing and telomere length regulation. *Genes & Development* **6**: 801-14.
- Hargrove, B.W., A. Bhattacharyya, A.M. Domitrovich, G.M. Kapler, K. Kirk, D.E. Shippen, and G.R. Kunkel. 1999. Identification of an essential proximal sequence element in the promoter of the telomerase RNA gene of *Tetrahymena thermophila*. *Nucleic Acids Research* **27**: 4269-75.
- Harley, C.B., A.B. Futcher, and C.W. Greider. 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**: 458-60.
- Harley, C.B., H. Vaziri, C.M. Counter, and R.C. Allsopp. 1992. The telomere hypothesis of cellular aging. *Experimental Gerontology* **27**: 375-82.
- Harrington, L., T. McPhail, V. Mar, W. Zhou, R. Oulton, M.B. Bass, I. Arruda, and M.O. Robinson. 1997a. A mammalian telomerase-associated protein. *Science* **275**: 973-7.
- Harrington, L., W. Zhou, T. McPhail, R. Oulton, D.S. Yeung, V. Mar, M.B. Bass, and M.O. Robinson. 1997b. Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits. *Genes & Development* **11**: 3109-15.
- Hartwell, L.H. 1974. *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriol Reviews* **38**: 164-98.
- Hayashi, N. and S. Murakami. 2002. STM1, a gene which encodes a guanine quadruplex binding protein, interacts with CDC13 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Genetics & Genomics: MGG* **267**: 806-13.
- Hecht, A., T. Laroche, S. Strahl-Bolsinger, S.M. Gasser, and M. Grunstein. 1995. Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell* **80**: 583-92.

- Hecht, A., S. Strahl-Bolsinger, and M. Grunstein. 1996. Spreading of transcriptional repressor SIR3 from telomeric heterochromatin. *Nature* **383**: 92-6.
- Henderson, E. 1995. Telomere DNA structure. In *Telomeres* (ed. E.H. Blackburn and C.W. Greider), pp. 11-34. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Henikoff, S. and M.K. Eghtedarzadeh. 1987. Conserved arrangement of nested genes at the *Drosophila* Gart locus. *Genetics* **117**: 711-25.
- Henson, J.D., A.A. Neumann, T.R. Yeager, and R.R. Reddel. 2002. Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene* **21**: 598-610.
- Hinkley, C.S., M.A. Blasco, W.D. Funk, J. Feng, B. Villeponteau, C.W. Greider, and W. Herr. 1998. The mouse telomerase RNA 5'-end lies just upstream of the telomerase template sequence. *Nucleic Acids Research* **26**: 532-6.
- Hoffman, C.S. and F. Winston. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**: 267-72.
- Holt, S.E., D.L. Aisner, J. Baur, V.M. Tesmer, M. Dy, M. Ouellette, J.B. Trager, G.B. Morin, D.O. Toft, J.W. Shay, W.E. Wright, and M.A. White. 1999. Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes & Development* **13**: 817-26.
- Horton, R.M., S.N. Ho, J.K. Pullen, H.D. Hunt, Z. Cai, and L.R. Pease. 1993. Gene splicing by overlap extension. *Methods in Enzymology* **217**: 270-9.
- Horvath, M.P., V.L. Schweiker, J.M. Bevilacqua, J.A. Ruggles, and S.C. Schultz. 1998. Crystal structure of the *Oxytricha nova* telomere end binding protein complexed with single strand DNA. *Cell* **95**: 963-74.
- Hsu, H.L., D. Gilley, S.A. Galande, M.P. Hande, B. Allen, S.H. Kim, G.C. Li, J. Campisi, T. Kohwi-Shigematsu, and D.J. Chen. 2000. Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining. *Genes & Development* **14**: 2807-12.
- Huang, W., J.M. Wong, and E. Bateman. 1996. TATA elements direct bi-directional transcription by RNA polymerases II and III. *Nucleic Acids Research* **24**: 1158-63.
- Huberman, J.A. 1990. Analysis of DNA replication origins and directions by two-dimensional gel electrophoresis. In *Gel electrophoresis of nucleic acids: a practical approach* (ed. D. Rickwood and B.D. Hanes), pp. 213-234. IRC press at Oxford University press, Oxford, NY.

- Huet, J. and A. Sentenac. 1987. TUF, the yeast DNA-binding factor specific for UASrpg upstream activating sequences: identification of the protein and its DNA-binding domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 3648-52.
- Hughes, T.R., S.K. Evans, R.G. Weilbaecher, and V. Lundblad. 2000a. The Est3 protein is a subunit of yeast telomerase. *Current Biology* **10**: 809-12.
- Hughes, T.R., R.G. Weilbaecher, M. Walterscheid, and V. Lundblad. 2000b. Identification of the single-strand telomeric DNA binding domain of the *Saccharomyces cerevisiae* Cdc13 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 6457-62.
- Imai, S., C.M. Armstrong, M. Kaeberlein, and L. Guarente. 2000. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* **403**: 795-800.
- James, B.D., G.J. Olsen, and N.R. Pace. 1989. Phylogenetic comparative analysis of RNA secondary structure. *Methods in Enzymology* **180**: 227-39.
- Janknecht, R. 2004. On the road to immortality: hTERT upregulation in cancer cells. *FEBS Lett* **564**: 9-13.
- Jarmolowski, A. and I.W. Mattaj. 1993. The determinants for Sm protein binding to *Xenopus* U1 and U5 snRNAs are complex and non-identical. *Embo Journal* **12**: 223-32.
- Jones, M.H. and C. Guthrie. 1990. Unexpected flexibility in an evolutionarily conserved protein-RNA interaction: genetic analysis of the Sm binding site. *Embo Journal* **9**: 2555-61.
- Kaeberlein, M., M. McVey, and L. Guarente. 1999. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes & Development* **13**: 2570-80.
- Kaminker, P.G., S.H. Kim, R.D. Taylor, Y. Zebajarian, W.D. Funk, G.B. Morin, P. Yaswen, and J. Campisi. 2001. TANK2, a new TRF1-associated poly(ADP-ribose) polymerase, causes rapid induction of cell death upon overexpression. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 35891-9.
- Kasulke, D., S. Seitz, and A.E. Ehrenhofer-Murray. 2002. A role for the *Saccharomyces cerevisiae* RENT complex protein Net1 in HMR silencing. *Genetics* **161**: 1411-23.
- Kaufer, N.F. and J. Potashkin. 2000. Analysis of the splicing machinery in fission yeast: a comparison with budding yeast and mammals. *Nucleic Acids Research* **28**: 3003-10.

- Kelleher, C., M.T. Teixeira, K. Forstemann, and J. Lingner. 2002. Telomerase: biochemical considerations for enzyme and substrate. *Trends in Biochemical Sciences* **27**: 572-9.
- Kilian, A., D.D. Bowtell, H.E. Abud, G.R. Hime, D.J. Venter, P.K. Keese, E.L. Duncan, R.R. Reddel, and R.A. Jefferson. 1997. Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Human Molecular Genetics* **6**: 2011-9.
- Kim, M.M., M.A. Rivera, I.L. Botchkina, R. Shalaby, A.D. Thor, and E.H. Blackburn. 2001. A low threshold level of expression of mutant-template telomerase RNA inhibits human tumor cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 7982-7.
- Kim, N.W., M.A. Piatyszek, K.R. Prowse, C.B. Harley, M.D. West, P.L. Ho, G.M. Coviello, W.E. Wright, S.L. Weinrich, and J.W. Shay. 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **266**: 2011-5.
- Kim, S.H., C. Beausejour, A.R. Davalos, P. Kaminker, S.J. Heo, and J. Campisi. 2004. TIN2 mediates functions of TRF2 at human telomeres. *Journal of Biological Chemistry* **3**: 3.
- Kipling, D. and H.J. Cooke. 1990. Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature* **347**: 400-2.
- Klein, F., T. Laroche, M.E. Cardenas, J.F. Hofmann, D. Schweizer, and S.M. Gasser. 1992. Localization of RAP1 and topoisomerase II in nuclei and meiotic chromosomes of yeast. *Journal of Cell Biology* **117**: 935-48.
- Klobutcher, L.A., M.T. Swanton, P. Donini, and D.M. Prescott. 1981. All gene-sized DNA molecules in four species of hypotrichs have the same terminal sequence and an unusual 3' terminus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**: 3015-9.
- Kurtzman, C.P. and C.J. Robnett. 2003. Phylogenetic relationships among yeasts of the 'Saccharomyces complex' determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Research* **3**: 417-32.
- LaBranche, H., S. Dupuis, Y. Ben-David, M.R. Bani, R.J. Wellinger, and B. Chabot. 1998. Telomere elongation by hnRNP A1 and a derivative that interacts with telomeric repeats and telomerase. *Nature Genetics* **19**: 199-202.
- Lagrange, T., A.N. Kapanidis, H. Tang, D. Reinberg, and R.H. Ebright. 1998. New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes & Development* **12**: 34-44.

- Lai, C.K., M.C. Miller, and K. Collins. 2002. Template boundary definition in Tetrahymena telomerase. *Genes & Development* **16**: 415-20.
- . 2003. Roles for RNA in telomerase nucleotide and repeat addition processivity. *Molecular Cell* **11**: 1673-83.
- Landry, J., A. Sutton, S.T. Tafrov, R.C. Heller, J. Stebbins, L. Pillus, and R. Sternglanz. 2000. The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 5807-11.
- Laroche, T., S.G. Martin, M. Gotta, H.C. Gorham, F.E. Pryde, E.J. Louis, and S.M. Gasser. 1998. Mutation of yeast Ku genes disrupts the subnuclear organization of telomeres. *Current Biology* **8**: 653-6.
- Larrivée, M., C. LeBel, and R.J. Wellinger. 2004. The generation of proper constitutive G-tails on yeast telomeres is dependent on the MRX complex. *Genes & Development* **18**: 1391-6.
- Le, S., J.K. Moore, J.E. Haber, and C.W. Greider. 1999. RAD50 and RAD51 define two pathways that collaborate to maintain telomeres in the absence of telomerase. *Genetics* **152**: 143-52.
- Le, S., R. Sternglanz, and C.W. Greider. 2000. Identification of two RNA-binding proteins associated with human telomerase RNA. *Molecular Biology of the Cell* **11**: 999-1010.
- Leeper, T., N. Leulliot, and G. Varani. 2003. The solution structure of an essential stem-loop of human telomerase RNA. *Nucleic Acids Research* **31**: 2614-21.
- Lendvay, T.S., D.K. Morris, J. Sah, B. Balasubramanian, and V. Lundblad. 1996. Senescence mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in telomere replication identify three additional EST genes. *Genetics* **144**: 1399-412.
- Lewis, L.K. and M.A. Resnick. 2000. Tying up loose ends: nonhomologous end-joining in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research* **451**: 71-89.
- Li, B. and A.J. Lustig. 1996. A novel mechanism for telomere size control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development* **10**: 1310-26.
- Li, B., S. Oestreich, and T. de Lange. 2000. Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. *Cell* **101**: 471-83.
- Li, S., J.E. Rosenberg, A.A. Donjacour, I.L. Botchkina, Y.K. Hom, G.R. Cunha, and E.H. Blackburn. 2004. Rapid inhibition of cancer cell growth induced by lentiviral delivery and expression of mutant-template telomerase RNA and anti-telomerase short-interfering RNA. *Cancer Research* **64**: 4833-40.

- Liang, F., M. Han, P.J. Romanienko, and M. Jasin. 1998. Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 5172-7.
- Liautard, J.P., J. Sri-Widada, C. Brunel, and P. Jeanteur. 1982. Structural organization of ribonucleoproteins containing small nuclear RNAs from HeLa cells. Proteins interact closely with a similar structural domain of U1, U2, U4 and U5 small nuclear RNAs. *Journal of Molecular Biology* **162**: 623-43.
- Licht, J.D. and K. Collins. 1999. Telomerase RNA function in recombinant *Tetrahymena* telomerase. *Genes & Development* **13**: 1116-25.
- Lin, J.J. and V.A. Zakian. 1995. An in vitro assay for *Saccharomyces* telomerase requires EST1. *Cell* **81**: 1127-35.
- . 1996. The *Saccharomyces* CDC13 protein is a single-strand TG1-3 telomeric DNA-binding protein in vitro that affects telomere behavior in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 13760-5.
- Lin, S.J., P.A. Defossez, and L. Guarente. 2000. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **289**: 2126-8.
- Lingner, J. and T.R. Cech. 1996. Purification of telomerase from *Euplotes aediculatus*: requirement of a primer 3' overhang. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 10712-7.
- Lingner, J., T.R. Cech, T.R. Hughes, and V. Lundblad. 1997a. Three Ever Shorter Telomere (EST) genes are dispensable for in vitro yeast telomerase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 11190-5.
- Lingner, J., L.L. Hendrick, and T.R. Cech. 1994. Telomerase RNAs of different ciliates have a common secondary structure and a permuted template. *Genes & Development* **8**: 1984-98.
- Lingner, J., T.R. Hughes, A. Shevchenko, M. Mann, V. Lundblad, and T.R. Cech. 1997b. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* **276**: 561-7.
- Linskens, M.H. and J.A. Huberman. 1990. Ambiguities in results obtained with 2D gel replicon mapping techniques. *Nucleic Acids Research* **18**: 647-52.

- Liu, D., A. Safari, M.S. O'Connor, D.W. Chan, A. Laegeler, J. Qin, and Z. Songyang. 2004. PTOPI interacts with POT1 and regulates its localization to telomeres. *Nature Cell Biology* **6**: 673-80.
- Livengood, A.J., A.J. Zaug, and T.R. Cech. 2002. Essential regions of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase RNA: separate elements for Est1p and Est2p interaction. *Molecular & Cellular Biology* **22**: 2366-74.
- Livingston, D.M. and D.M. Kupfer. 1977. Control of *Saccharomyces cerevisiae* 2microN DNA replication by cell division cycle genes that control nuclear DNA replication. *Journal of Molecular Biology* **116**: 249-60.
- Loayza, D. and T. de Lange. 2003. POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature* **423**: 1013-8.
- Loubbardi, A., C. Marcireau, F. Karst, and M. Guilloton. 1995. Sterol uptake induced by an impairment of pyridoxal phosphate synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and sequencing of the PDX3 gene encoding pyridoxine (pyridoxamine) phosphate oxidase. *Journal of Bacteriology* **177**: 1817-23.
- Louis, E.J. and J.E. Haber. 1990. Mitotic recombination among subtelomeric Y' repeats in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **124**: 547-59.
- Louis, E.J., E.S. Naumova, A. Lee, G. Naumov, and J.E. Haber. 1994. The chromosome end in yeast: its mosaic nature and influence on recombinational dynamics. *Genetics* **136**: 789-802.
- Lowell, J.E., A.I. Roughton, V. Lundblad, and L. Pillus. 2003. Telomerase-independent proliferation is influenced by cell type in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **164**: 909-21.
- Lukowiak, A.A., A. Narayanan, Z.H. Li, R.M. Terns, and M.P. Terns. 2001. The snoRNA domain of vertebrate telomerase RNA functions to localize the RNA within the nucleus. *Rna* **7**: 1833-44.
- Lundblad, V. and E.H. Blackburn. 1993. An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence. *Cell* **73**: 347-60.
- Lundblad, V. and J.W. Szostak. 1989. A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* **57**: 633-43.
- Lustig, A.J. 2001. Cdc13 subcomplexes regulate multiple telomere functions. *Nature Structural Biology* **8**: 297-9.
- . 2003. Clues to catastrophic telomere loss in mammals from yeast telomere rapid deletion. *Nature Reviews Genetics* **4**: 916-23.

- Ly, H., E.H. Blackburn, and T.G. Parslow. 2003a. Comprehensive structure-function analysis of the core domain of human telomerase RNA. *Molecular & Cellular Biology* **23**: 6849-56.
- Ly, H., L. Xu, M.A. Rivera, T.G. Parslow, and E.H. Blackburn. 2003b. A role for a novel 'trans-pseudoknot' RNA-RNA interaction in the functional dimerization of human telomerase. *Genes & Development*. **17**: 1078-83.
- Lydall, D. and T. Weinert. 1995. Yeast checkpoint genes in DNA damage processing: implications for repair and arrest. *Science* **270**: 1488-91.
- Mantell, L.L. and C.W. Greider. 1994. Telomerase activity in germline and embryonic cells of *Xenopus*. *EMBO Journal* **13**: 3211-7.
- Marathe, S.V. and J.E. McEwen. 1995. Vectors with the gus reporter gene for identifying and quantitating promoter regions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **154**: 105-7.
- Marcand, S., V. Brevet, and E. Gilson. 1999. Progressive cis-inhibition of telomerase upon telomere elongation. *EMBO Journal* **18**: 3509-19.
- Marcand, S., V. Brevet, C. Mann, and E. Gilson. 2000. Cell cycle restriction of telomere elongation. *Current Biology* **10**: 487-90.
- Marcand, S., E. Gilson, and D. Shore. 1997. A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast. *Science* **275**: 986-90.
- Maringele, L. and D. Lydall. 2004. EXO1 plays a role in generating type I and type II survivors in budding yeast. *Genetics* **166**: 1641-9.
- Martin-Rivera, L. and M.A. Blasco. 2001. Identification of functional domains and dominant negative mutations in vertebrate telomerase RNA using an in vivo reconstitution system. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 5856-65.
- Marusic, L., M. Anton, A. Tidy, P. Wang, B. Villeponteau, and S. Bacchetti. 1997. Reprogramming of telomerase by expression of mutant telomerase RNA template in human cells leads to altered telomeres that correlate with reduced cell viability. *Molecular & Cellular Biology* **17**: 6394-401.
- Mason, D.X., E. Goneska, and C.W. Greider. 2003. Stem-loop IV of tetrahymena telomerase RNA stimulates processivity in trans. *Molecular & Cellular Biology* **23**: 5606-13.
- Mattern, K.A., S.J. Swiggers, A.L. Nigg, B. Lowenberg, A.B. Houtsmuller, and J.M. Zijlmans. 2004. Dynamics of protein binding to telomeres in living cells: implications for telomere structure and function. *Molecular & Cellular Biology* **24**: 5587-94.

- McClintock, B. 1941. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* **26**: 234-282.
- McCormick-Graham, M. and D.P. Romero. 1995. Ciliate telomerase RNA structural features. *Nucleic Acids Research* **23**: 1091-7.
- McEachern, M.J. and E.H. Blackburn. 1994. A conserved sequence motif within the exceptionally diverse telomeric sequences of budding yeasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 3453-7.
- . 1995. Runaway telomere elongation caused by telomerase RNA gene mutations. *Nature* **376**: 403-9.
- McEachern, M.J. and J.B. Hicks. 1993. Unusually large telomeric repeats in the yeast *Candida albicans*. *Molecular & Cellular Biology* **13**: 551-60.
- McEachern, M.J., D.H. Underwood, and E.H. Blackburn. 2002. Dynamics of telomeric DNA turnover in yeast. *Genetics* **160**: 63-73.
- McElligott, R. and R.J. Wellinger. 1997. The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *EMBO Journal* **16**: 3705-14.
- Melek, M., E.C. Greene, and D.E. Shippen. 1996. Processing of nontelomeric 3' ends by telomerase: default template alignment and endonucleolytic cleavage. *Molecular & Cellular Biology* **16**: 3437-45.
- Melo, J. and D. Toczyski. 2002. A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Current Opinion in Cell Biology* **14**: 237-45.
- Meyerson, M., C.M. Counter, E.N. Eaton, L.W. Ellisen, P. Steiner, S.D. Caddle, L. Ziaugra, R.L. Beijersbergen, M.J. Davidoff, Q. Liu, S. Bacchetti, D.A. Haber, and R.A. Weinberg. 1997. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* **90**: 785-95.
- Miller, M.C. and K. Collins. 2000. The *Tetrahymena* p80/p95 complex is required for proper telomere length maintenance and micronuclear genome stability. *Molecular Cell* **6**: 827-37.
- Mitchell, J.R., J. Cheng, and K. Collins. 1999a. A box H/ACA small nucleolar RNA-like domain at the human telomerase RNA 3' end. *Molecular & Cellular Biology* **19**: 567-76.
- Mitchell, J.R. and K. Collins. 2000. Human telomerase activation requires two independent interactions between telomerase RNA and telomerase reverse transcriptase. *Molecular Cell* **6**: 361-71.

- Mitchell, J.R., E. Wood, and K. Collins. 1999b. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* **402**: 551-5.
- Mitton-Fry, R.M., E.M. Anderson, T.R. Hughes, V. Lundblad, and D.S. Wuttke. 2002. Conserved structure for single-stranded telomeric DNA recognition. *Science* **296**: 145-7.
- Moazed, D., A. Kistler, A. Axelrod, J. Rine, and A.D. Johnson. 1997. Silent information regulator protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*: a SIR2/SIR4 complex and evidence for a regulatory domain in SIR4 that inhibits its interaction with SIR3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 2186-91.
- Monson, E.K., D. de Bruin, and V.A. Zakian. 1997. The yeast Cac1 protein is required for the stable inheritance of transcriptionally repressed chromatin at telomeres. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 13081-6.
- Morales, C.P., S.E. Holt, M. Ouellette, K.J. Kaur, Y. Yan, K.S. Wilson, M.A. White, W.E. Wright, and J.W. Shay. 1999. Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nature Genetics* **21**: 115-8.
- Moretti, P., K. Freeman, L. Coodly, and D. Shore. 1994. Evidence that a complex of SIR proteins interacts with the silencer and telomere-binding protein RAP1. *Genes & Development* **8**: 2257-69.
- Moriarty, T.J., S. Huard, S. Dupuis, and C. Autexier. 2002. Functional multimerization of human telomerase requires an RNA interaction domain in the N terminus of the catalytic subunit. *Molecular & Cellular Biology* **22**: 1253-65.
- Morin, G.B. 1989. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* **59**: 521-9.
- Moyzis, R.K., J.M. Buckingham, L.S. Cram, M. Dani, L.L. Deaven, M.D. Jones, J. Meyne, R.L. Ratliff, and J.R. Wu. 1988. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**: 6622-6.
- Muller, H.J. 1938. The remaking of chromosomes. *Collecting Net* **8**: 182-195, 198.
- Munoz-Jordan, J.L., G.A. Cross, T. de Lange, and J.D. Griffith. 2001. t-loops at trypanosome telomeres. *Embo Journal* **20**: 579-88.

- Murti, K.G. and D.M. Prescott. 1999. Telomeres of polytene chromosomes in a ciliated protozoan terminate in duplex DNA loops. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 14436-9.
- Naito, T., A. Matsuura, and F. Ishikawa. 1998. Circular chromosome formation in a fission yeast mutant defective in two ATM homologues. *Nature Genetics* **20**: 203-6.
- Nakamura, T.M., J.P. Cooper, and T.R. Cech. 1998. Two modes of survival of fission yeast without telomerase. *Science* **282**: 493-6.
- Nakamura, T.M., G.B. Morin, K.B. Chapman, S.L. Weinrich, W.H. Andrews, J. Lingner, C.B. Harley, and T.R. Cech. 1997. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* **277**: 955-9.
- Neidle, S. and G.N. Parkinson. 2003. The structure of telomeric DNA. *Current Opinion in Structural Biology* **13**: 275-83.
- Nielsen, L. and J.E. Edstrom. 1993. Complex telomere-associated repeat units in members of the genus *Chironomus* evolve from sequences similar to simple telomeric repeats. *Molecular & Cellular Biology* **13**: 1583-9.
- Niida, H., T. Matsumoto, H. Satoh, M. Shiwa, Y. Tokutake, Y. Furuichi, and Y. Shinkai. 1998. Severe growth defect in mouse cells lacking the telomerase RNA component. *Nature Genetics* **19**: 203-6.
- Nikitina, T. and C.L. Woodcock. 2004. Closed chromatin loops at the ends of chromosomes. *Journal of Cell Biology* **166**: 161-5. Epub 2004 Jul 12.
- Niu, H., J. Xia, and N.F. Lue. 2000. Characterization of the interaction between the nuclease and reverse transcriptase activity of the yeast telomerase complex. *Molecular & Cellular Biology* **20**: 6806-15.
- Nugent, C.I., T.R. Hughes, N.F. Lue, and V. Lundblad. 1996. Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science* **274**: 249-52.
- O'Connor, M.S., A. Safari, D. Liu, J. Qin, and Z. Songyang. 2004. The human Rap1 protein complex and modulation of telomere length. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 28585-91.
- O'Reilly, M., S.A. Teichmann, and D. Rhodes. 1999. Telomerases. *Current Opinion in Structural Biology* **9**: 56-65.
- Ohki, R., T. Tsurimoto, and F. Ishikawa. 2001. In vitro reconstitution of the end replication problem. *Molecular & Cellular Biology* **21**: 5753-66.

- Olovnikov, A.M. 1973. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *Journal of Theoretical Biology* **41**: 181-90.
- Opresko, P.L., M. Otterlei, J. Graakjaer, P. Bruheim, L. Dawut, S. Kolvraa, A. May, M.M. Seidman, and V.A. Bohr. 2004. The Werner Syndrome Helicase and Exonuclease Cooperate to Resolve Telomeric D Loops in a Manner Regulated by TRF1 and TRF2. *Molecular Cell* **14**: 763-774.
- Oulton, R. and L. Harrington. 2004. A human telomerase-associated nuclease. *Molecular Biology of the Cell* **15**: 3244-56.
- Pang, T.L., C.Y. Wang, C.L. Hsu, M.Y. Chen, and J.J. Lin. 2003. Exposure of single-stranded telomeric DNA causes G2/M cell cycle arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 9318-21. Epub 2003 Jan 7.
- Paques, F. and J.E. Haber. 1999. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**: 349-404.
- Pardue, M.L. and P.G. DeBaryshe. 2003. Retrotransposons provide an evolutionarily robust non-telomerase mechanism to maintain telomeres. *Annual Review of Genetics* **37**: 485-511.
- Parenteau, J. 2002. Implication de la nucléase Rad27p dans le maintien et la réplication des télomères. *Thèse de Doctorat, Université de Sherbrooke*.
- Peng, Y., I.S. Mian, and N.F. Lue. 2001. Analysis of telomerase processivity: mechanistic similarity to HIV-1 reverse transcriptase and role in telomere maintenance. *Molecular Cell* **7**: 1201-11.
- Pennock, E., K. Buckley, and V. Lundblad. 2001. Cdc13 delivers separate complexes to the telomere for end protection and replication. *Cell* **104**: 387-96.
- Peterson, S.E., A.E. Stellwagen, S.J. Diede, M.S. Singer, Z.W. Haimberger, C.O. Johnson, M. Tzoneva, and D.E. Gottschling. 2001. The function of a stem-loop in telomerase RNA is linked to the DNA repair protein Ku. *Nature Genetics* **27**: 64-7.
- Pich, U., J. Fuchs, and I. Schubert. 1996. How do Alliaceae stabilize their chromosome ends in the absence of TTTAGGG sequences? *Chromosome Research* **4**: 207-13.
- Pleij, C.W. and L. Bosch. 1989. RNA pseudoknots: structure, detection, and prediction. *Methods in Enzymology* **180**: 289-303.

- Plessel, G., U. Fischer, and R. Luhrmann. 1994. m3G cap hypermethylation of U1 small nuclear ribonucleoprotein (snRNP) in vitro: evidence that the U1 small nuclear RNA-(guanosine-N2)-methyltransferase is a non-snRNP cytoplasmic protein that requires a binding site on the Sm core domain. *Molecular & Cellular Biology* **14**: 4160-72.
- Pogacic, V., F. Dragon, and W. Filipowicz. 2000. Human H/ACA small nucleolar RNPs and telomerase share evolutionarily conserved proteins NHP2 and NOP10. *Molecular & Cellular Biology* **20**: 9028-40.
- Prescott, J. and E.H. Blackburn. 1997a. Functionally interacting telomerase RNAs in the yeast telomerase complex. *Genes & Development* **11**: 2790-800.
- . 1997b. Telomerase RNA mutations in *Saccharomyces cerevisiae* alter telomerase action and reveal nonprocessivity in vivo and in vitro. *Genes & Development* **11**: 528-40.
- Prowse, K.R., A.A. Avilion, and C.W. Greider. 1993. Identification of a nonprocessive telomerase activity from mouse cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 1493-7.
- Pryde, F.E. and E.J. Louis. 1997. *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. A review. *Biochemistry (Mosc)* **62**: 1232-41.
- . 1999. Limitations of silencing at native yeast telomeres. *EMBO Journal* **18**: 2538-50.
- Qi, H. and V.A. Zakian. 2000. The *Saccharomyces* telomere-binding protein Cdc13p interacts with both the catalytic subunit of DNA polymerase alpha and the telomerase-associated est1 protein. *Genes & Development* **14**: 1777-88.
- Rabl, C. 1885. Über Zelltheilung. *Morphologisches Jahrbuch* **10**: 214-330.
- Raker, V.A., K. Hartmuth, B. Kastner, and R. Luhrmann. 1999. Spliceosomal U snRNP core assembly: Sm proteins assemble onto an Sm site RNA nonanucleotide in a specific and thermodynamically stable manner. *Molecular & Cellular Biology* **19**: 6554-65.
- Ray, A. and K.W. Runge. 1999. The yeast telomere length counting machinery is sensitive to sequences at the telomere-nontelomere junction. *Molecular & Cellular Biology* **19**: 31-45.
- Reddel, R.R. 2003. Alternative lengthening of telomeres, telomerase, and cancer. *Cancer Lett* **194**: 155-62.
- Reichenbach, P., M. Hoss, C.M. Azzalin, M. Nabholz, P. Bucher, and J. Lingner. 2003. A human homolog of yeast Est1 associates with telomerase and

- uncaps chromosome ends when overexpressed. *Current Biology* **13**: 568-74.
- Rine, J. 1991. Gene overexpression in studies of *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Enzymology* **194**: 239-51.
- Ritchie, K.B. and T.D. Petes. 2000. The Mre11p/Rad50p/Xrs2p complex and the Tel1p function in a single pathway for telomere maintenance in yeast. *Genetics* **155**: 475-9.
- Romero, D.P. and E.H. Blackburn. 1991. A conserved secondary structure for telomerase RNA. *Cell* **67**: 343-53.
- Roth, C.W., F. Kobeski, M.F. Walter, and H. Biessmann. 1997. Chromosome end elongation by recombination in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Molecular & Cellular Biology* **17**: 5176-83.
- Rudenko, G., M. Cross, and P. Borst. 1998. Changing the end: antigenic variation orchestrated at the telomeres of African trypanosomes. *Trends in Microbiology* **6**: 113-6.
- Sandell, L.L. and V.A. Zakian. 1993. Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell* **75**: 729-39.
- Saretzki, G. 2003. Telomerase inhibition as cancer therapy. *Cancer Lett* **194**: 209-19.
- Schaffitzel, C., I. Berger, J. Postberg, J. Hanes, H.J. Lipps, and A. Pluckthun. 2001. In vitro generated antibodies specific for telomeric guanine-quadruplex DNA react with *Stylonychia lemnae* macronuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 8572-7.
- Scherf, A., R. Hernandez-Rivas, P. Buffet, E. Bottius, C. Benatar, B. Pouvelle, J. Gysin, and M. Lanzer. 1998. Antigenic variation in malaria: in situ switching, relaxed and mutually exclusive transcription of var genes during intra-erythrocytic development in *Plasmodium falciparum*. *Embo Journal* **17**: 5418-26.
- Schramke, V., P. Luciano, V. Brevet, S. Guillot, Y. Corda, M.P. Longhese, E. Gilson, and V. Geli. 2004. RPA regulates telomerase action by providing Est1p access to chromosome ends. *Nature Genetics* **36**: 46-54.
- Seimiya, H., H. Sawada, Y. Muramatsu, M. Shimizu, K. Ohko, K. Yamane, and T. Tsuruo. 2000. Involvement of 14-3-3 proteins in nuclear localization of telomerase. *Embo Journal* **19**: 2652-61.

- Seto, A.G., A.J. Livengood, Y. Tzfati, E.H. Blackburn, and T.R. Cech. 2002. A bulged stem tethers Est1p to telomerase RNA in budding yeast. *Genes & Development* **16**: 2800-12.
- Seto, A.G., K. Umansky, Y. Tzfati, A.J. Zaug, E.H. Blackburn, and T.R. Cech. 2003. A template-proximal RNA paired element contributes to *Saccharomyces cerevisiae* telomerase activity. *Rna* **9**: 1323-32.
- Seto, A.G., A.J. Zaug, S.G. Sobel, S.L. Wolin, and T.R. Cech. 1999. *Saccharomyces cerevisiae* telomerase is an Sm small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nature* **401**: 177-80.
- Shampay, J. and E.H. Blackburn. 1988. Generation of telomere-length heterogeneity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**: 534-8.
- Shampay, J., J.W. Szostak, and E.H. Blackburn. 1984. DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature* **310**: 154-7.
- Shay, J.W. and S. Bacchetti. 1997. A survey of telomerase activity in human cancer. *European Journal of Cancer* **33**: 787-91.
- Shippen-Lentz, D. and E.H. Blackburn. 1989. Telomere terminal transferase activity from *Euplotes crassus* adds large numbers of TTTTGGGG repeats onto telomeric primers. *Molecular & Cellular Biology* **9**: 2761-4.
- . 1990. Functional evidence for an RNA template in telomerase. *Science* **247**: 546-52.
- Shore, D. 1994. RAP1: a protean regulator in yeast. *Trends in Genetics* **10**: 408-12.
- Shore, D. and K. Nasmyth. 1987. Purification and cloning of a DNA binding protein from yeast that binds to both silencer and activator elements. *Cell* **51**: 721-32.
- Shou, W., J.H. Seol, A. Shevchenko, C. Baskerville, D. Moazed, Z.W. Chen, J. Jang, H. Charbonneau, and R.J. Deshaies. 1999. Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. *Cell* **97**: 233-44.
- Siddiqui-Jain, A., C.L. Grand, D.J. Bearss, and L.H. Hurley. 2002. Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 11593-8.
- Signon, L., A. Malkova, M.L. Naylor, H. Klein, and J.E. Haber. 2001. Genetic requirements for RAD51- and RAD54-independent break-induced

- replication repair of a chromosomal double-strand break. *Molecular & Cellular Biology* **21**: 2048-56.
- Sikorski, R.S. and P. Hieter. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**: 19-27.
- Sinclair, D.A. and L. Guarente. 1997. Extrachromosomal rDNA circles--a cause of aging in yeast. *Cell* **91**: 1033-42.
- Singer, M.S. and D.E. Gottschling. 1994. TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science* **266**: 404-9.
- Smale, S.T. and J.T. Kadonaga. 2003. The RNA polymerase II core promoter. *Annual Review of Biochemistry* **72**: 449-79.
- Smith, C.D., D.L. Smith, J.L. DeRisi, and E.H. Blackburn. 2003. Telomeric protein distributions and remodeling through the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* **14**: 556-70.
- Smith, S. and T. de Lange. 2000. Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. *Current Biology* **10**: 1299-302.
- Smith, J., H. Zou, and R. Rothstein. 2000. Characterization of genetic interactions with RFA1: the role of RPA in DNA replication and telomere maintenance. *Biochimie* **82**: 71-8.
- Smogorzewska, A. and T. de Lange. 2002. Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *Embo Journal* **21**: 4338-48.
- Smogorzewska, A., B. van Steensel, A. Bianchi, S. Oelmann, M.R. Schaefer, G. Schnapp, and T. de Lange. 2000. Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Molecular & Cellular Biology* **20**: 1659-68.
- Snow, B.E., N. Erdmann, J. Cruickshank, H. Goldman, R.M. Gill, M.O. Robinson, and L. Harrington. 2003. Functional conservation of the telomerase protein Est1p in humans. *Current Biology* **13**: 698-704.
- Song, H., Y. Li, G. Chen, Z. Xing, J. Zhao, K.K. Yokoyama, T. Li, and M. Zhao. 2004. Human MCRS2, a cell-cycle-dependent protein, associates with LPTS/PinX1 and reduces the telomere length. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **316**: 1116-23.
- Sperger, J.M. and T.R. Cech. 2001. A stem-loop of *Tetrahymena* telomerase RNA distant from the template potentiates RNA folding and telomerase activity. *Biochemistry* **40**: 7005-16.

- Starling, J.A., J. Maule, N.D. Hastie, and R.C. Allshire. 1990. Extensive telomere repeat arrays in mouse are hypervariable. *Nucleic Acids Research* **18**: 6881-8.
- Steiner, B.R., K. Hidaka, and B. Futcher. 1996. Association of the Est1 protein with telomerase activity in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 2817-21.
- Stellwagen, A.E., Z.W. Haimberger, J.R. Veatch, and D.E. Gottschling. 2003. Ku interacts with telomerase RNA to promote telomere addition at native and broken chromosome ends. *Genes & Development* **17**: 2384-95.
- Strahl-Bolsinger, S., A. Hecht, K. Luo, and M. Grunstein. 1997. SIR2 and SIR4 interactions differ in core and extended telomeric heterochromatin in yeast. *Genes & Development* **11**: 83-93.
- Sugawara, N. and J.W. Szostak. 1983. Recombination between sequences in nonhomologous positions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**: 5675-9.
- Sung, P., K.M. Trujillo, and S. Van Komen. 2000. Recombination factors of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research* **451**: 257-75.
- Taddei, A. and S.M. Gasser. 2004. Multiple pathways for telomere tethering: functional implications of subnuclear position for heterochromatin formation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1677**: 120-8.
- Taggart, A.K., S.C. Teng, and V.A. Zakian. 2002. Est1p as a cell cycle-regulated activator of telomere-bound telomerase. *Science* **297**: 1023-6.
- Tarsounas, M., P. Munoz, A. Claas, P.G. Smiraldi, D.L. Pittman, M.A. Blasco, and S.C. West. 2004. Telomere maintenance requires the RAD51D recombination/repair protein. *Cell* **117**: 337-47.
- Teixeira, M.T., M. Arneric, P. Sperisen, and J. Lingner. 2004. Telomere length homeostasis is achieved via a switch between telomerase- extendible and - nonextendible states. *Cell* **117**: 323-35.
- ten Dam, E., A. van Belkum, and K. Pleij. 1991. A conserved pseudoknot in telomerase RNA. *Nucleic Acids Research* **19**: 6951.
- Teng, S.C., J. Chang, B. McCowan, and V.A. Zakian. 2000. Telomerase-independent lengthening of yeast telomeres occurs by an abrupt Rad50p-dependent, Rif-inhibited recombinational process. *Molecular Cell* **6**: 947-52.
- Teng, S.C. and V.A. Zakian. 1999. Telomere-telomere recombination is an efficient bypass pathway for telomere maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & Cellular Biology* **19**: 8083-93.

- Tesmer, V.M., L.P. Ford, S.E. Holt, B.C. Frank, X. Yi, D.L. Aisner, M. Ouellette, J.W. Shay, and W.E. Wright. 1999. Two inactive fragments of the integral RNA cooperate to assemble active telomerase with the human protein catalytic subunit (hTERT) in vitro. *Molecular & Cellular Biology* **19**: 6207-16.
- Tissenbaum, H.A. and L. Guarente. 2001. Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **410**: 227-30.
- Tommerup, H., A. Dousmanis, and T. de Lange. 1994. Unusual chromatin in human telomeres. *Molecular & Cellular Biology* **14**: 5777-85.
- Traverso, E.E., C. Baskerville, Y. Liu, W. Shou, P. James, R.J. Deshaies, and H. Charbonneau. 2001. Characterization of the Net1 cell cycle-dependent regulator of the Cdc14 phosphatase from budding yeast. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 21924-31.
- Tsukamoto, Y., J. Kato, and H. Ikeda. 1997. Silencing factors participate in DNA repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **388**: 900-3.
- Tzfati, Y., T.B. Fulton, J. Roy, and E.H. Blackburn. 2000. Template boundary in a yeast telomerase specified by RNA structure. *Science* **288**: 863-7.
- Tzfati, Y., Z. Knight, J. Roy, and E.H. Blackburn. 2003. A novel pseudoknot element is essential for the action of a yeast telomerase. *Genes & Development* **17**: 1779-88.
- Urlaub, H., V.A. Raker, S. Kostka, and R. Luhrmann. 2001. Sm protein-Sm site RNA interactions within the inner ring of the spliceosomal snRNP core structure. *Embo Journal* **20**: 187-96.
- Van Dyke, M.W., L.D. Nelson, R.G. Weilbaecher, and D.V. Mehta. 2004. Stm1p, a G4 quadruplex and purine motif triplex nucleic acid-binding protein, interacts with ribosomes and subtelomeric Y' DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 24323-33.
- van Steensel, B. and T. de Lange. 1997. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* **385**: 740-3.
- van Steensel, B., A. Smogorzewska, and T. de Lange. 1998. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* **92**: 401-13.
- Vaziri, H. and S. Benchimol. 1998. Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Current Biology* **8**: 279-82.
- Vega-Palas, M.A., E. Martin-Figueroa, and F.J. Florencio. 2000. Telomeric silencing of a natural subtelomeric gene. *Mol Gen Genet* **263**: 287-91.

- Vega-Palas, M.A., S. Venditti, and E. Di Mauro. 1997. Telomeric transcriptional silencing in a natural context. *Nature Genetics* **15**: 232-3.
- Vialard, J.E., C.S. Gilbert, C.M. Green, and N.F. Lowndes. 1998. The budding yeast Rad9 checkpoint protein is subjected to Mec1/Tel1-dependent hyperphosphorylation and interacts with Rad53 after DNA damage. *Embo Journal* **17**: 5679-88.
- Vieira, J. and J. Messing. 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**: 259-68.
- Virta-Pearlman, V., D.K. Morris, and V. Lundblad. 1996. Est1 has the properties of a single-stranded telomere end-binding protein. *Genes & Development* **10**: 3094-104.
- Visintin, R., K. Craig, E.S. Hwang, S. Prinz, M. Tyers, and A. Amon. 1998. The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Molecular Cell* **2**: 709-18.
- Vulliamy, T., A. Marrone, I. Dokal, and P.J. Mason. 2002. Association between aplastic anaemia and mutations in telomerase RNA. *Lancet* **359**: 2168-70.
- Vulliamy, T., A. Marrone, F. Goldman, A. Dearlove, M. Bessler, P.J. Mason, and I. Dokal. 2001. The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Nature* **413**: 432-5.
- Walmsley, R.M. and T.D. Petes. 1985. Genetic control of chromosome length in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**: 506-10.
- Watson, J.D. 1972. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nature New Biology* **239**: 197-201.
- Weiler, K.S. and B.T. Wakimoto. 1995. Heterochromatin and gene expression in *Drosophila*. *Annual Review of Genetics* **29**: 577-605.
- Weinert, T.A. and L.H. Hartwell. 1990. Characterization of RAD9 of *Saccharomyces cerevisiae* and evidence that its function acts posttranslationally in cell cycle arrest after DNA damage. *Molecular & Cellular Biology* **10**: 6554-64.
- Weinrich, S.L., R. Pruzan, L. Ma, M. Ouellette, V.M. Tesmer, S.E. Holt, A.G. Bodnar, S. Lichtsteiner, N.W. Kim, J.B. Trager, R.D. Taylor, R. Carlos, W.H. Andrews, W.E. Wright, J.W. Shay, C.B. Harley, and G.B. Morin. 1997. Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. *Nature Genetics* **17**: 498-502.

- Wellinger, R.J., K. Ethier, P. Labrecque, and V.A. Zakian. 1996. Evidence for a new step in telomere maintenance. *Cell* **85**: 423-33.
- Wellinger, R.J. and D. Sen. 1997. The DNA structures at the ends of eukaryotic chromosomes. *European Journal of Cancer* **33**: 735-49.
- Wellinger, R.J., A.J. Wolf, and V.A. Zakian. 1993a. Origin activation and formation of single-strand TG1-3 tails occur sequentially in late S phase on a yeast linear plasmid. *Molecular & Cellular Biology* **13**: 4057-65.
- . 1993b. Saccharomyces telomeres acquire single-strand TG1-3 tails late in S phase. *Cell* **72**: 51-60.
- Wenz, C., B. Enenkel, M. Amacker, C. Kelleher, K. Damm, and J. Lingner. 2001. Human telomerase contains two cooperating telomerase RNA molecules. *EMBO Journal* **20**: 3526-34.
- Westhof, E. and P. Auffinger. 2000. RNA tertiary structure. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (ed. R.A. Meyers), pp. 5222-5232. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Will, C.L. and R. Luhrmann. 2001. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Current Opinion in Cell Biology* **13**: 290-301.
- Wotton, D. and D. Shore. 1997. A novel Rap1p-interacting factor, Rif2p, cooperates with Rif1p to regulate telomere length in Saccharomyces cerevisiae. *Genes & Development* **11**: 748-60.
- Wright, J.H., D.E. Gottschling, and V.A. Zakian. 1992. Saccharomyces telomeres assume a non-nucleosomal chromatin structure. *Genes & Development* **6**: 197-210.
- Wright, J.H. and V.A. Zakian. 1995. Protein-DNA interactions in soluble telosomes from Saccharomyces cerevisiae. *Nucleic Acids Research* **23**: 1454-60.
- Wright, W.E. and J.W. Shay. 1992. The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. *Experimental Gerontology* **27**: 383-9.
- Wright, W.E., V.M. Tesmer, K.E. Huffman, S.D. Levene, and J.W. Shay. 1997. Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes & Development* **11**: 2801-9.
- Wyrick, J.J., F.C. Holstege, E.G. Jennings, H.C. Causton, D. Shore, M. Grunstein, E.S. Lander, and R.A. Young. 1999. Chromosomal landscape of nucleosome-dependent gene expression and silencing in yeast. *Nature* **402**: 418-21.

- Xia, J., Y. Peng, I.S. Mian, and N.F. Lue. 2000. Identification of functionally important domains in the N-terminal region of telomerase reverse transcriptase. *Molecular & Cellular Biology* **20**: 5196-207.
- Ye, J.Z., J.R. Donigian, M. Van Overbeek, D. Loayza, Y. Luo, A.N. Krutchinsky, B.T. Chait, T. de Lange, D. Hockemeyer, and S.M. Hooper. 2004a. TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 47264-71.
- Ye, J.Z., D. Hockemeyer, A.N. Krutchinsky, D. Loayza, S.M. Hooper, B.T. Chait, and T. de Lange. 2004b. POT1-interacting protein PIP1: a telomere length regulator that recruits POT1 to the TIN2/TRF1 complex. *Genes & Development* **18**: 1649-54.
- Ye, J.Z. and T. de Lange. 2004c. TIN2 is a tankyrase 1 PARP modulator in the TRF1 telomere length control complex. *Nature Genetics* **36**: 618-23.
- Yeager, T.R., A.A. Neumann, A. Englezou, L.I. Huschtscha, J.R. Noble, and R.R. Reddel. 1999. Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer Research* **59**: 4175-9.
- Zachariae, W., A. Shevchenko, P.D. Andrews, R. Ciosk, M. Galova, M.J. Stark, M. Mann, and K. Nasmyth. 1998. Mass spectrometric analysis of the anaphase-promoting complex from yeast: identification of a subunit related to cullins. *Science* **279**: 1216-9.
- Zahler, A.M. and D.M. Prescott. 1988. Telomere terminal transferase activity in the hypotrichous ciliate *Oxytricha nova* and a model for replication of the ends of linear DNA molecules. *Nucleic Acids Research* **16**: 6953-72.
- Zahler, A.M., J.R. Williamson, T.R. Cech, and D.M. Prescott. 1991. Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures. *Nature* **350**: 718-20.
- Zaman, Z., C. Heid, and M. Ptashne. 2002. Telomere looping permits repression "at a distance" in yeast. *Current Biology* **12**: 930-3.
- Zaug, A.J. and T.R. Cech. 1995. Analysis of the structure of *Tetrahymena* nuclear RNAs in vivo: telomerase RNA, the self-splicing rRNA intron, and U2 snRNA. *Rna* **1**: 363-74.
- Zaug, A.J., J. Linger, and T.R. Cech. 1996. Method for determining RNA 3' ends and application to human telomerase RNA. *Nucleic Acids Research* **24**: 532-3.

- Zhang, X., V. Mar, W. Zhou, L. Harrington, and M.O. Robinson. 1999. Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells. *Genes & Development* **13**: 2388-99.
- Zhong, Z., L. Shiue, S. Kaplan, and T. de Lange. 1992. A mammalian factor that binds telomeric TTAGGG repeats in vitro. *Molecular & Cellular Biology* **12**: 4834-43.
- Zhou, J., K. Hidaka, and B. Futcher. 2000. The Est1 subunit of yeast telomerase binds the Tlc1 telomerase RNA. *Molecular & Cellular Biology* **20**: 1947-55.
- Zhou, T. and C.M. Chiang. 2001. The intronless and TATA-less human TAF(II)55 gene contains a functional initiator and a downstream promoter element. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 25503-11.
- Zhou, X.Z. and K.P. Lu. 2001. The Pin2/TRF1-interacting protein PinX1 is a potent telomerase inhibitor. *Cell* **107**: 347-59.
- Zhu, X.D., B. Kuster, M. Mann, J.H. Petrini, and T. de Lange. 2000. Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nature Genetics* **25**: 347-52.
- Zhu, X.D., L. Niedernhofer, B. Kuster, M. Mann, J.H. Hoeijmakers, and T. de Lange. 2003. ERCC1/XPF removes the 3' overhang from uncapped telomeres and represses formation of telomeric DNA-containing double minute chromosomes. *Molecular Cell* **12**: 1489-98.

ANNEXES

Principaux plasmides utilisés dans le cadre de cette étude.....	210
Souches de <i>S. cerevisiae</i> utilisées lors de cette étude.....	211
Autorisation de l'éditeur.....	212
Autorisation des co-auteurs.....	213
Manuscrit édité.....	214

Plasmide	Description	Références
pVL438	<i>CDC13</i> dans pRS416	Evans et Lundblad, 1999
pAZ1RAD52	<i>RAD52</i> dans pAZ1	Beeler et al., 1994
pADCEN26	<i>ADH1</i> dans pRS316	Cette étude
pADCEN27	<i>TLC1</i> délété G dans pADCEN26	Cette étude
pADCEN28	<i>TLC1</i> délété H dans pADCEN26	Cette étude
pADCEN29	<i>TLC1</i> délété I dans pADCEN26	Cette étude
pADCEN30	<i>TLC1</i> délété J dans pADCEN26	Cette étude
pADCEN31	<i>TLC1</i> délété K dans pADCEN26	Cette étude
pADCEN32	<i>TLC1</i> délété A à F dans pADCEN26	Cette étude
pADCEN33	<i>TLC1</i> délété G à K dans pADCEN26	Cette étude
pADCEN34	<i>TLC1</i> délété A à K dans pADCEN26	Cette étude
pADCEN35	<i>TLC1</i> SK1 dans pADCEN26	Cette étude
pADCEN36	<i>TLC1</i> S288C (BY) dans pADCEN26	Cette étude
pADCEN50	Ψ K I interrompu (total) dans pADCEN26	Cette étude
pADCEN51	Ψ K I interrompu (partiel) dans pADCEN26	Cette étude
pADCEN52	Ψ K I rétabli dans pADCEN26	Cette étude
pADCEN53	Ψ K I de <i>S. bayanus</i> dans pADCEN26	Cette étude

Souche	Génotype	Références
MVL26A	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ1 his3-Δ200 leu2-Δ1 cdc13-2^{est2}</i>	Lendvay et al., 1996
LLY15	<i>MATα ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ1 his3-Δ200 leu2-Δ1 VR-ADE2-T tlc1::LEU2 rad52::HIS3</i>	Cette étude
CSHY76	<i>MATa/α ade2/ade2 ura3/ura3 leu2/leu2 his3/his3 trp1/trp1 TLC1/tlc1::LEU2 RAD52/rad52::TRP1</i>	Le et al., 1999



ELSEVIER

13 December 2004

Our Ref: HG/jj/Dec04/J150

Your Ref:

Alain T. Dandjinou
 PhD student
 Université de Sherbrooke
 Dép. Micro. 2001, 12ème Avenue Nord
 Sherbrooke QC
 Canada J1H 5N4

Dear Alain T. Dandjinou

CURRENT BIOLOGY, Vol 14, No 13, 2004, pp 1148-1158, Dandjinou et al: "A Phylogenetically Based..."

As per your letter dated 10 December 2004, we hereby grant you permission to reprint the aforementioned material at no charge **in your thesis** subject to the following conditions:

1. If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies.
2. Suitable acknowledgment to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

 "Reprinted from Publication title, Vol number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier".
3. Reproduction of this material is confined to the purpose for which permission is hereby given.
4. This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only. For other languages please reapply separately for each one required. Permission excludes use in an electronic form. Should you have a specific electronic project in mind please reapply for permission.
5. This includes permission for the National Library of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission.

Yours sincerely

Helen Gainford
Rights Manager

Your future requests will be handled more quickly if you complete the online form at
www.elsevier.com/wps/find/obtainpermissionform.cws_home/obtainpermissionform

**AUTORISATION D'INTÉGRATION
D'UN ARTICLE ÉCRIT EN COLLABORATION
À UN MÉMOIRE OU UNE THÈSE**

Je (ou nous), soussignée(s), soussigné(s), co-auteure(s), co-auteur(s) de l'article intitulé : A PHYLOGENETICALLY
BASED SECONDARY STRUCTURE FOR THE YEAST TELOMERASE RNA

reconnais (reconnaissons) que ledit article sera inclus comme partie constituante du mémoire ☐ de la thèse ☒

de l'étudiant(e) (nom) : ALAIN DANDJINOI

inscrit(e) au programme de DOCTORAT MICROBIOLOGIE

de la Faculté de MÉDECINE de l'Université de Sherbrooke

En foi de quoi, j'ai (nous avons) signé cet engagement en un nombre suffisant d'exemplaires*

Signature _____ Date : 14/09/04

Nom Stéphanie Larose

Coordonnées Département de microbiologie, Faculté médecine
3001 12^e Avenue Nord, Sherbrooke, Québec

Signature _____ Date : 14/9/04

Nom JEAN-FRANÇOIS Lucier

Coordonnées Département de microbiologie, Faculté de médecine
3001 12^e Avenue Nord, Sherbrooke, Québec

Signature _____ Date : 14/9/4

Nom Marité Lévesque

Coordonnées Département de Microbiologie, Faculté de Médecine
3001 12^e Ave Nord, Sherbrooke, Qc

Signature _____ Date : _____

Nom _____

Coordonnées _____

* Un exemplaire pour l'étudiante, l'étudiant, un exemplaire pour chaque personne signataire et un exemplaire pour le Service des bibliothèques (à remettre avec le mémoire ou la thèse au moment du dépôt final).

Annexes

A Phylogenetically Based Secondary Structure for the Yeast Telomerase RNA

Alain T. Dandjinou, Nancy Lévesque,
Stéphanie Larose, Jean-François Lucier,
Sherif Abou Elela, and Raymund J. Wellinger*
Groupe ARN/RNA Group
Department of Microbiology and Infectious
Diseases
Faculty of Medicine
Université de Sherbrooke
3001 12th Avenue N.
Sherbrooke, QC J1H 5N4
Canada

Summary

Background: Telomerase is a ribonucleoprotein complex whose RNA moiety dictates the addition of specific simple sequences onto chromosomes ends. While relevant for certain human genetic diseases, the contribution of the essential telomerase RNA to RNP assembly still remains unclear. Phylogenetic analyses of vertebrate and ciliate telomerase RNAs revealed conserved elements that potentially organize protein subunits for RNP function. In contrast, the yeast telomerase RNA could not be fitted to any known structural model, and the limited number of known sequences from *Saccharomyces* species did not permit the prediction of a yeast specific conserved structure.

Results: We cloned and analyzed the complete telomerase RNA loci (*TLC1*) from all known *Saccharomyces* species belonging to the “sensu stricto” group. Complementation analyses in *S. cerevisiae* and end mappings of mature RNAs ensured the relevance of the cloned sequences. By using phylogenetic comparative analysis coupled with in vitro enzymatic probing, we derived a secondary structure prediction of the *Saccharomyces cerevisiae* *TLC1* RNA. This conserved secondary structure prediction includes a central domain that is likely to orchestrate DNA synthesis and at least two accessory domains important for RNA stability and telomerase recruitment. The structure also reveals a potential tertiary interaction between two loops in the central core.

Conclusions: The predicted secondary structure of the *TLC1* RNA of *S. cerevisiae* reveals a distinct folding pattern featuring well-separated but conserved functional elements. The predicted structure now allows for a detailed and rationally designed study to the structure-function relationships within the telomerase RNP-complex in a genetically tractable system.

Introduction

Telomeres, the terminal portion of the linear eukaryotic chromosomes, are composed of specialized nucleoprotein complexes that ensure protection of chromosomal DNA [1, 2]. Telomeric DNA comprises specific, short

direct repeats, and their maintenance is assured by a specialized ribonucleoparticle (RNP) called telomerase. Minimally, telomerase contains the catalytic protein component TERT (telomerase reverse transcriptase; Est2p in yeast [3, 4]) and an associated RNA moiety (TER, telomerase RNA; *TLC1* in yeast, [5, 6]). The addition of telomere-specific repeated sequences is templated by a small segment residing on this essential RNA moiety [5, 7]. In addition to this templating function, the TERT/telomerase RNA complex provides constitutive or transient binding sites for a variety of other proteins, some of which are essential for in vivo activity [4, 8, 9]. For humans, telomerase activation is closely associated with cellular immortalization and, ultimately, cancer development, but the clinical importance of telomerase extends beyond this role in cancer since several genetic diseases, such as dyskeratosis congenita and aplastic anemia, have been associated with mutations in the RNA subunit of telomerase [6]. Therefore, the RNA component of telomerase may have additional and so far unknown roles in cellular metabolism, which may be associated with RNP biogenesis.

In *Saccharomyces cerevisiae*, the telomerase RNA (*TLC1*) is about 1200 bases long, transcribed by RNA polymerase II, and matured through acquisition of a 5'-trimethylguanosine cap and in association with Sm proteins [5, 10, 11]. Previous work based on mutagenesis, deletions, and sequence comparisons between distant yeasts established a few functional elements of this RNA: an essential central portion that is associated with TERT/Est2p [12], a conserved bulged stem that is important for Est1p association [13], a conserved short stem that serves as template boundary element [14], and a stem-loop element that binds the Yku-complex [15, 16]. However, the global structure of the *TLC1* RNA remained unknown, which hampered the understanding of the mechanism of the telomerase RNP biogenesis and function. Phylogenetic analysis of primary sequences is amongst the most powerful tools to arrive at a working model for the secondary structure of RNAs [17–19]. This approach has been successfully used to establish secondary structures of the ciliate and vertebrate telomerase RNAs [20–23]. However, for *Saccharomyces* species, the limited availability of sequences derived from evolutionary closely related species as well as the large size of the *TLC1* RNA were major obstacles for a similar approach.

Here, we report the cloning, sequencing, and functional analysis of the *TLC1* genes of all *Saccharomyces* species being part of the closely related “sensu stricto” group [24, 25]. Individual pairwise comparisons of the individual sequences to the *Saccharomyces cerevisiae* S288C RNA revealed homologies that range between 98% and 59%, which allowed reliable sequence alignment and covariation analyses of base pairs in predicted stems. Selected regions in the predicted structure were subsequently confirmed by biochemical mapping. The proposed secondary structure is consistent with the previously established subelements and reveals a cen-

*Correspondence: raymund.wellinger@usherbrooke.ca

Table 1. Complementation of a *TLC1* Disruption in *S. Cerevisiae* S288C by *TLC1* Loci from the "Sensu Stricto" Species

Generation of Growth	Cells Grown on YC-TRP-LEU-URA					Cells Grown on FOA	Cells Grown on YC-TRP-LEU	
	20	40	60	80	100	120, 20 ^a	140, 40 ^a	160, 60 ^a
<i>S. cer.</i> S288C pADCEN36	++	++	++	++	++	+/-	+/-	-
<i>S. cer.</i> SK1 pADCEN35	++	++	++	++	++	+/-	+/-	-
<i>S. paradoxus</i> pADCEN42	++	++	++	++	++	+/-	+/-	-
<i>S. cariocanus</i> pADCEN43	++	++	++	++	++	+	+/-	-
<i>S. mikatae</i> pADCEN44	++	++	++	++	++	+	+/-	-
<i>S. kudriavzevii</i> pADCEN45	++	++	++	++	++	+/-	+/-	-
<i>S. bayanus</i> pADCEN46	++	+	+/-	-	++	+	-	-
<i>S. pastorianus</i> pADCEN49	++	++	++	++	++	+/-	-	-
None pADCEN26	+	+/-	-	-	-	-	-	-

^aGenerations after loss of plasmid.

S. cerevisiae strains (CSHY76) lacking the *TLC1* and *RAD52* genes and bearing the indicated plasmids (leftmost column) were grown for 100 generations on YC-TRP-LEU-URA medium to determine the ability of the *TLC1* homolog-containing vector to complement senescence. Two independent transformants were selected for each *TLC1* homolog. Subsequent growth on 5-FOA medium and on YC-LEU-TRP medium established plasmid dependence for survival. Plasmid pADCEN36 is used as positive control. Empty plasmid pADCEN26 is used as negative control. Viability is scored based on colony size after 3 days. Abbreviations: ++, growth rate similar to that of the positive control; -, absence of growth; +, few senescing cells; +/-, many senescing cells.

tral domain that is likely to associate with TERT/Est2p to orchestrate DNA synthesis, as well as at least two accessory domains important for RNA stability and telomerase recruitment. Finally, a comparison of the proposed structure for the yeast RNA with those of the vertebrate and ciliate RNAs suggests that the central core element may have a conserved structural organization.

Results and Discussion

Identification of New Telomerase RNA Genes of *Saccharomyces* Species of the "Sensu Stricto" Group

In order to elucidate the secondary structure of telomerase RNA in *Saccharomyces cerevisiae*, we identified strains in which the RNA sequences are close enough to allow juxtaposition of homologous regions but diverge sufficiently to allow for covariation rates adequate for structural prediction. Based on published sequence similarities, all species from the *Saccharomyces* "sensu stricto" group were selected. These include *S. cerevisiae* S288C and its variant *S. cerevisiae* SK1, *S. paradoxus*, *S. cariocanus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, *S. bayanus*, and *S. pastorianus*. The latter, which is thought to be a natural hybrid between *S. cerevisiae* and *S. bayanus*, was included in order to increase sequence variability, thereby increasing chances of covariation [24, 25]. Primary sequences of telomerase RNAs are known to diverge significantly, even between closely related species [20, 21], and a direct amplification of the sequences from the selected species proved unsuccessful. However, protein encoding sequences bordering the *TLC1* loci are more conserved and underlying DNA sequences could be predicted more reliably, particularly for stretches of highly conserved amino acids of the respective proteins [25]. We took advantage of this fact and the relative compactness of yeast genomes to clone the complete *TLC1* loci from all the species mentioned above by using this nearest neighbor-based strategy (see Experimental Procedures in Supplemental Data). The candidate homo-

logs were inserted into pADCEN26, downstream of a transcription terminator region of the *ADH1* gene. Constructs containing the various cloned *TLC1* loci were introduced into *S. cerevisiae*, which lacked its own *TLC1* gene as well as the *RAD52* gene (Table 1). In this host, a disruption of both telomerase function by a deletion of the *TLC1* gene and an abolition of the major recombination pathway by deleting *RAD52* leads to progressive telomere shortening with an incidental loss of viability after 40–50 generations, called senescence [26]. Clearly, except for the locus derived from *S. bayanus*, the genes from *S. cerevisiae* (S288C; positive control, as well as SK1) and the candidate genes derived from *S. paradoxus*, *S. cariocanus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, and *S. pastorianus* were able to complement the *TLC1* disruption. Plasmid-loss experiments confirmed that complementation was dependent on the introduced loci (Table 1). Work from the Lundblad laboratory has shown that the *S. bayanus TLC1* gene, when present on a 2 μ m plasmid, can also partially rescue the telomere replication defect of a *S. cerevisiae tlc1-Δ* strain (A. Chappell and V. Lundblad, personal communication). The actual lengths of telomeric repeat tracts were not at the level of wild-type for all clones, suggesting incomplete complementation by some genes. We conclude that the cloned loci of all species can direct transcription of an at least partially complementing RNA in *S. cerevisiae*. Therefore, the heterologously expressed RNAs must mature and fold into a similar structure as one of the host cells in order to be able to associate with the various endogenous *S. cerevisiae* proteins to form an active RNP.

RNA Sizes and the Mature 5'- and 3'-Ends

In *S. cerevisiae*, the *TLC1* RNA is present in two distinct forms: a less-abundant, polyadenylated transcript and a much more abundant, nonpolyadenylated form of about 1200 nucleotides (nt) [5, 10]. The nonpolyadenylated species is thought to be the functional RNA present in the RNP, and its 3'-end has been mapped to various positions after a Sm-protein binding element ([10, 27]

Annexes

[illegible]



Figure 2. Size Estimation of TLC1 RNA Homologs

Total RNA isolated from *S. cerevisiae* S288C (Scec), *S. cerevisiae* SK1 (Scek), *S. paradoxus* (Spar), *S. cariocanus* (Scar), *S. mikatae* (Smik), *S. kudriavzevii* (Skud), and *S. bayanus* (Sbay) was subjected to Northern blot analysis by using species-specific probes. TLC1 RNA species in *S. cerevisiae* S288C and a size marker (M) position are indicated.

and see below). Taking a previously proposed 5'-end for the *S. cerevisiae* RNA and the completely conserved Sm binding site as markers, the aligned sequences derived from all species predicted RNA sizes ranging from about 1160 nt (*S. cerevisiae*, *S. cariocanus*, and *S. paradoxus*) to 1220 nt (*S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, *S. bayanus*, and *S. pastorianus*; Figure 1). In order to establish whether such RNAs are indeed expressed in the various species, we performed Northern blots with RNA derived from all the species listed above (Figure 2). A mix of species-specific probes revealed the presence of a major RNA band in all species and, in some cases, a minor band. The estimated sizes for the major bands coincide well with the predicted sizes derived from the sequencing efforts. We conclude that the cloned sequences are expressed in the particular species as RNAs of the predicted sizes, strongly suggesting that we indeed cloned the genes encoding the functional TLC1 RNAs of the corresponding species.

In order to properly align the telomerase RNA sequences, we mapped the *in vivo* 5'-ends of the TLC1 RNAs by primer extension with total cellular RNA from *S. cerevisiae* (S288C, SK1), *S. paradoxus*, *S. cariocanus*, *S. mikatae*, and *S. kudriavzevii* (example for *S. cerevisiae* is shown in Figure 3). Primer extensions were performed by using species-specific radiolabeled primers that annealed 30–70 nucleotides downstream of the 5' terminus that was previously proposed for the *S. cerevisiae* RNA [5]. Surprisingly, the major band corresponding to the *S. cerevisiae* RNA 5'-end was mapped to a guanosine residue 10 nucleotides downstream of the previously proposed 5'-end (Figure 3). The position of this major band representing the mature 5'-end remained unchanged, irrelevant of the position of the primer used (data not shown). Therefore, we designate this nucleotide as the "+1" position of the *S. cerevisiae* TLC1 RNA.

As expected, the major 5'-ends of the *S. paradoxus* and *S. cariocanus* TLC1 RNAs, the sequences of which are highly homologous to that of *S. cerevisiae* in this region, mapped to the same nucleotide position, indicating a conserved mature 5'-end for these three RNA species (Figure 1 and data not shown). The determined 5'-ends of the *S. mikatae* and *S. kudriavzevii* RNAs are 17 and 20 nucleotides upstream with respect to the *S. cerevisiae* 5'-end. Curiously, in *S. cerevisiae*, a minor fraction of the TLC1 RNA molecules also has extended 5'-ends (lane 4, Figure 3). It remains to be established whether these molecules are mature TMG-capped RNAs or potential processing intermediates. Inclusion of the extra nucleotides did not influence the overall folding of the complete RNA molecule derived from any of the species and for simplicity reasons, they were not incorporated in the structure proposed below. The 3' terminus of *S. cerevisiae* TLC1 RNA was previously shown to be located downstream the Sm binding site [10, 27]. In order to compare the 3'-ends of *S. cerevisiae* with those of other species, we performed 3'-end mappings by using RNase protection assays. The RNA probe covered the region from 61 nt upstream to 295 nt downstream relative to the *S. cerevisiae* Sm site. As previously observed by similar RNase protection assays [27], the major 3'-end of the *S. cerevisiae* TLC1 RNA is located in a run of uridine residues, about ten nucleotides downstream of the Sm site (Figure 1 and data not shown). However, we also detected minor bands, indicating the presence of additional 3'-ends about 80 nucleotides further downstream (data not shown). These positions are consistent with previous 3'-end determinations using an RT-PCR method [10] and also with the sequences retrieved originally on cDNA clones [5]. The sequence around the Sm site is 100% conserved in all species analyzed here, such that the alignment of the 3'-ends at this site can be made with high confidence. Therefore, we aligned the sequences at this major 3'-end located about ten bases downstream of the Sm binding site for the prediction of the conserved TLC1 structure. In order to investigate the impact of the ~80 nucleotide extension downstream of the Sm site, we independently folded the RNAs containing such an extension. This analysis demonstrated that the 3' extension can fold into what appears to be an independent, conserved structure by itself but which does not influence or change the folding of the global structure reported in Figure 4 (data not shown).

Taken together, our data establish the mature 5'-end of the TLC1 RNA and suggest that a major 3'-end is located about ten nucleotides downstream of the con-

Figure 1. Sequence Alignment and Consensus of Telomerase RNA Sequences of the *Saccharomyces* "Sensu Stricto" Complex

The sequences of telomerase RNAs from *S. cerevisiae* S288C (Scec), *S. cerevisiae* SK1 (Scek), *S. paradoxus* (Spar), *S. cariocanus* (Scar), *S. mikatae* (Smik), *S. kudriavzevii* (Skud), *S. bayanus* (Sbay) and *S. pastorianus* (Spas) were aligned as described in the text. Dashes (-) denote gaps introduced within the alignment. The major transcription initiation site determined in Scec is indicated by +1. The numbering, marked with underscores every tenth nucleotide above the alignment, is according to the telomerase RNA sequence from Scec. The RNAs terminate ~10 nucleotides downstream of the Sm site, and the total number of nucleotides for the individual RNAs is indicated at the end of the respective sequence. In the consensus sequence (line: Cons), invariant residues for all species are denoted by uppercase letters; lowercase letters indicate nucleotides conserved among 85% of the species; dots represent variable nucleotides. Nucleotides determining complementary strands of proposed helices (line: Helices) are delineated with brackets enclosing the respective helix identification as well as forward or backward arrowheads denoting 5' or 3' strands, respectively. The consensus sequences of the template region and the Sm motif are underlined and labeled.

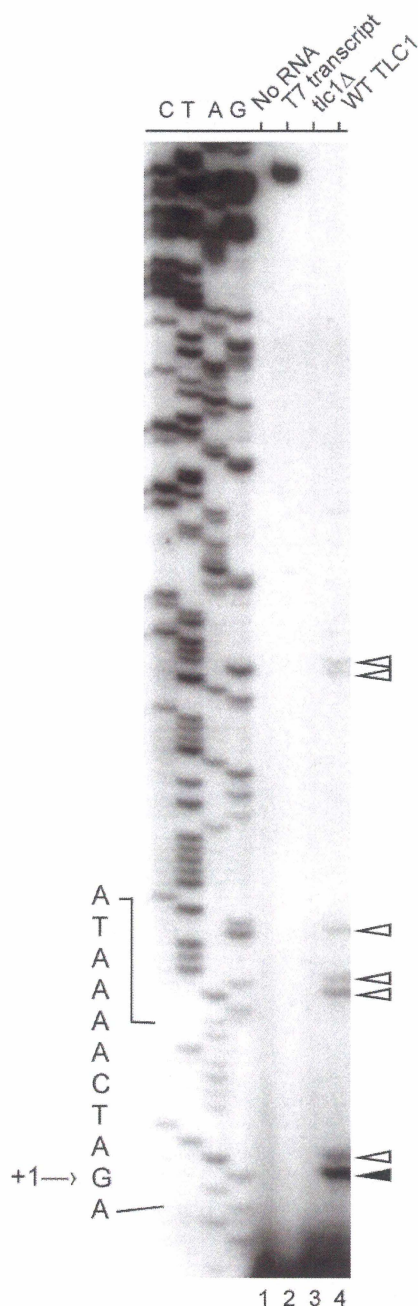


Figure 3. The Major 5'-End of the TLC1 RNA in *S. cerevisiae*. Oligonucleotide PXCER23 complementary to nucleotides 23–39 was used for primer extension analysis of telomerase RNA of *S. cerevisiae* S288C strains containing a wild-type *TLC1* gene (lane 4) or harboring a deletion of the *TLC1* gene (lane 3). For the sequencing reactions, the cloned *TLC1* gene was used as template. The solid arrow denotes the major 5'-end. Open arrows denote TLC1 RNA species with additional 5' extensions. Reactions were also performed without RNA (lane 1) or in the presence of an in vitro generated TLC1 transcript starting 122 nucleotides upstream the major in vivo 5'-end (lane 2).

served Sm site. These anchor points allowed a robust sequence alignment of all RNAs and formed the basis for the structure prediction.

Establishment of a Secondary-Structure Model Based on Phylogenetic Analysis

In order to derive a secondary structure for the yeast telomerase RNA, we followed an iterative procedure consisting of sequence alignment, a computer-aided folding that predicts thermodynamically stable helices, and covariation searches (see Experimental Procedures). The overall similarities between the various RNAs and that of *S. cerevisiae* S288C ranged in between 59% (*S. pastorianus*) and 98% (*S. cerevisiae* SK1), which is within the optimal range for performing phylogenetic comparative analyses (Figure 1 and Table S1). We note that this primary sequence divergence of the TLC1 RNAs of the species in the “sensu stricto” group is comparable to existing data on these species [24, 25]. Thus, the TLC1 sequences determined here are consistent with the notion that *S. cerevisiae* is about equidistant to *S. bayanus* and *S. pastorianus*. While this work was in progress, whole genome sequences of two distantly related “sensu lato” yeasts became available (*S. kluyveri* and *S. castellii* [25]). In order to determine the extent of homology between the “sensu stricto” and “sensu lato” telomerase RNA sequences, we searched for homologs in these genomes by using conserved sequence elements described above, including the predicted template sequences. We were able to identify a potential sequence for the *S. castellii* TLC1 RNA, but due to the increased primary sequence divergence, a reliable sequence alignment for the complete RNA was not possible (data not shown). In addition, chromosomal synteny in the region of *TLC1* is not maintained between the “sensu stricto” and “sensu lato” species, and therefore, a cloning approach using the nearest-neighbor was not feasible for the other “sensu lato” species. This suggests that attempts to enhance the confidence of phylogenetic analyses on the predicted secondary structure of the TLC1 RNA for *Saccharomyces* species will require the identification of sequences in new “sensu stricto” variants or species or in depth biochemical mappings.

The overall predicted structure of the RNA comprises seven major helical domains organized around a central, multibranched loop (Figures 4 and 5) (designated helices I through VII). Helices I–VI emerge directly from the central loop, while domain VII is linked to domain I by a short, single-stranded region. The 5'- and 3'-ends of the RNAs are predicted to be in close vicinity, which is typical for noncoding yeast RNAs [28]. Helical segments within a domain can be considered very likely to exist if covariation is found for two or more base pairs within the given helix [17, 18]. Based on these criteria, the existence of 10 of the predicted 15 helices is well supported by covariation analysis (Table 2). Helix I is unusually long and unlikely to be organized in a linear fashion as drawn out here. Upon inspection of the sequences involved in the formation of this helix, we noticed stretches with highly differing degrees of either primary sequence conservation or occurrence of covariations (Figure 4). As a first approximation, we divided helix I

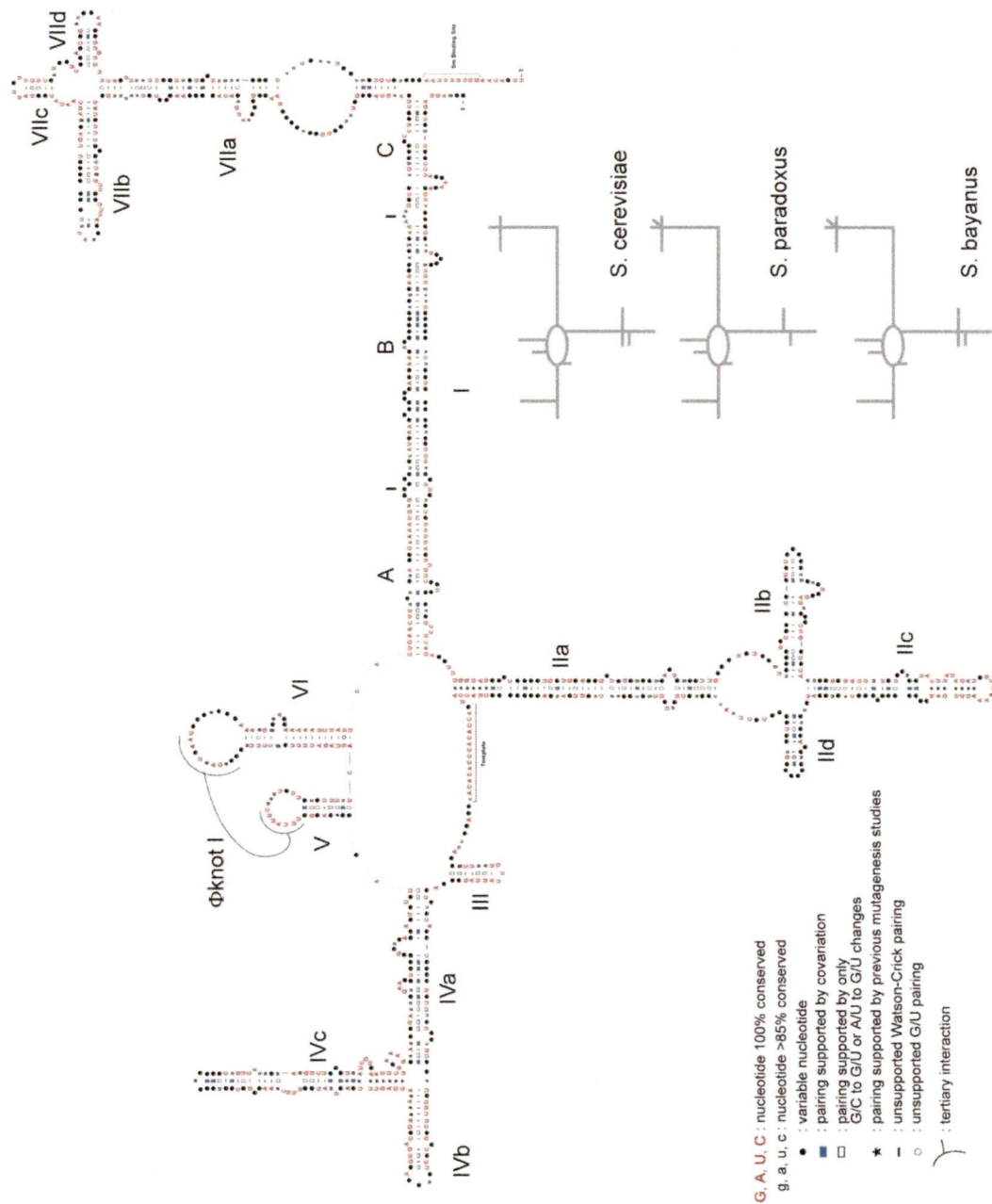


Figure 4. Minimum Consensus Structure of Telomerase RNA in Species of the *Saccharomyces* "Sensu Stricto" Complex

The conserved core incorporates only consensus nucleotides that were identifiable in all the molecules inspected. Symbols used are defined in the key in the lower left. The template region and the Sm motif are labeled, and their consensus nucleotides are bracketed. Simplified drawings corresponding to structures for *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, and *S. bayanus* indicating certain species-specific differences are outlined in the lower right. Letters A, B, C on stem I indicate a possible subdivision of stem I (see text).

into three segments (Figure 5): the sequences making up segment A are highly conserved, predicting a conserved function. Segment C is less conserved but does not include significant instances of covariation. In contrast, segment B is made up of many variable nucleotides and

contains 13 covarying base pairs (bp) over the stretch of 43 bp (for *S. cerevisiae*; Figures 4 and 5). Therefore, the helical nature of segment B is extremely well supported by the covariation analysis. In our model, we retain segments A and C as helices only because we

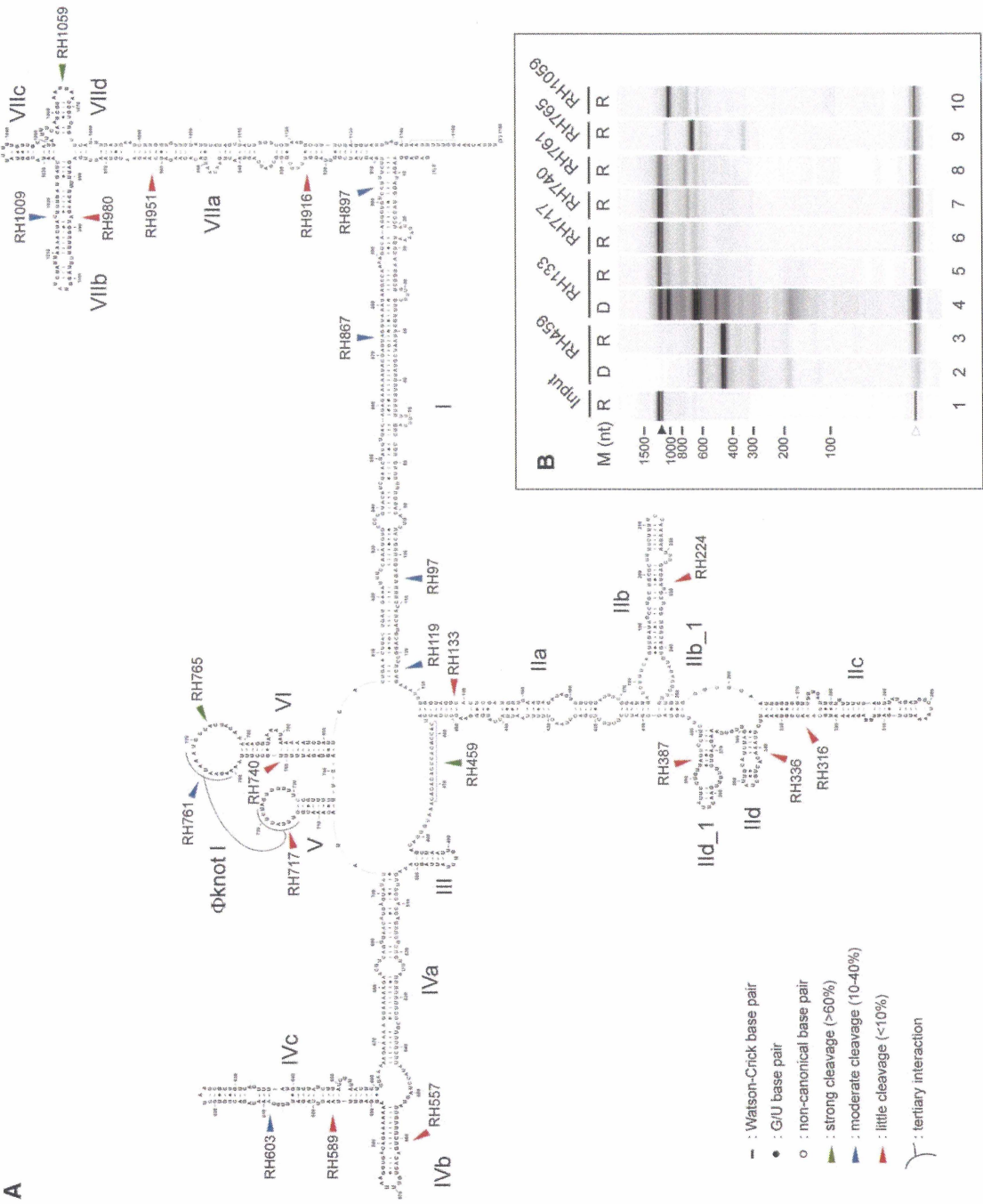


Figure 5. Secondary-Structure Model of Telomerase RNA of *S. cerevisiae* Based on Phylogenetic Comparison and RNase H Probing
(A) The secondary-structure model was established by comparative phylogenetic analyses in conjunction with RNase H probing data. Symbols used are defined in the key in the lower left. Helical domains are numbered from 5' to 3' in their order of occurrence as I to VII. The consensus nucleotides for the template region and the Sm motif are bracketed. Positions are referred to by nucleotide positions, using +1 as defined in Figure 3. Sites targeted by complementary DNA oligonucleotides in RNase H experiments are indicated with an arrow.
(B) In vitro susceptibility of TLC1 RNA to oligonucleotide/RNase H cleavage. The synthetic TLC1 RNA transcript was submitted to RNase H treatment in denaturing conditions (D) or after renaturation (R), and the cleavage products were fractionated on a RNA 6000 Nano LabChip. Typical examples of TLC1 RNA probings are shown in the gel-like image. The input (lane 1) represents 1.4 pmol of TLC1 RNA mock treated in the absence of any oligonucleotide. Probe RH459 (lanes 2 and 3), which is complementary to the single-stranded template region, is used as positive control (>60% cleavage in renatured conditions). Probe RH133 (lanes 4 and 5), which targets the template boundary element, a

Table 2. Base Pairings in the TLC1 RNA Secondary-Structure Model

Paired Regions			Number of Base-Pair Positions Displaying Covariation ^c	Number of Base-Pair Positions 100% Conserved	Number of Base-Pair Positions with G/C to G/U or A/U to G/U Changes
Helix Number ^a	Nucleotide Positions ^b	Length (bp)			
I	7-126/805-909	86	16 (19%)	20 (23%)	16 (19%)
Ila	132-176/409-456	32	5 (16%)	10 (31%)	11 (34%)
Ilb	185-210/214-241	22	3 (13%)	2 (9%)	4 (18%)
Ilb_1 ^d	252-256/404-408	5	0	0	0
Ilc	263-297/305-334	27	6 (22%)	8 (30%)	5 (18%)
Ild	337-346/351-359	7	3 (43%)	0	1 (14%)
Ild_1 ^a	366-381/386-400	10	0	0	0
III	484-489/495-500	6	0	3 (50%)	4 (67%)
IVa	504-543/666-704	30	7 (23%)	1 (3%)	8 (27%)
IVb	554-567/574-587	13	0	7 (54%)	3 (23%)
IVc	589-621/625-660	26	6 (23%)	12 (46%)	5 (19%)
V	707-714/731-738	8	2 (25%)	1 (12%)	5 (63%)
VI	741-757/780-802	17	0	12 (71%)	1 (6%)
VIIa	912-976/1077-1133	42	5 (12%)	7 (17%)	5 (12%)
VIIb	977-1000/1005-1027	19	4 (21%)	6 (32%)	3 (16%)
VIIc	1028-1036/1041-1049	8	0	2 (25%)	1 (13%)
VIIId	1056-1062/1069-1075	6	1 (17%)	1 (17%)	4 (67%)
Pseudoknot I	715-722/761-768	8	0	5 (63%)	2 (25%)

^aHelix numbers are from Figures 1 and 5.^bPositions refer to +1 as defined in Figures 1 and 3.^cFor details of covariation determination see Experimental Procedures.^dThis helix is not present in *S. pastorianus*.^eThis helix is not present in *S. paradoxus* and *S. cariocanus*.

could not obtain evidence supporting an alternative structure. Three of the nonsupported helices (stems III, IVb, and VI) include sequences that are highly conserved ($\geq 50\%$ complete sequence conservation, see Figure 4). This very high conservation may suggest a conserved function, but in the absence of covariation, it cannot be distinguished whether the function is supported by the predicted structure, a different structure, or a primary sequence. Other unsupported stems include VIIc and VIIId, which reside in close proximity to each other, and their structure, thus, at this point, also remained unclear (Figures 4 and 5).

In order to clarify some of these uncertainties and to directly test the capacity of the RNA to fold in vitro, we probed in vitro transcribed TLC1 RNA of *S. cerevisiae* S288C for RNase H accessibility by using specific DNA oligonucleotides targeting selected regions on the RNA. The premise of this approach is that single-stranded regions will be accessible to binding by oligonucleotide probes, leading to RNase H-dependent cleavage, while helical regions will not. We first probed two regions of almost certain structure to evaluate the fidelity of the approach and to establish controls for the quality of the RNase H cleavage reaction. The template region was chosen as a positive control for cleavage. This region is likely to be single-stranded as it must be accessible for the association with telomeric DNA, and for other telomerase RNAs, the region was previously shown to

be single-stranded in vivo [19]. As negative control, we directed an oligonucleotide to helical region IIa, a short template-proximal stem that is involved in a template boundary function [14]. As predicted, the template region of TLC1 RNA was fully accessible to oligonucleotide hybridization and RNase H cleavage, even after RNA renaturation (oligo RH459, Figure 5). In contrast, helix IIa was only appreciably cleaved when the RNA was denatured (oligo RH133, Figure 5). The clean cleavage patterns observed with these limited control sites also suggested that the in vitro RNA folding produces a fairly homogeneous RNA structure. Complementary oligonucleotides targeting other specific regions of the RNA were thus used in subsequent RNase H experiments as outlined on the predicted structure in Figure 5 (cleavage patterns at selected sites are shown in Figure 5B, and data not shown). Since the RNase H accessibility experiments were performed on in vitro transcribed and folded RNA, they do not necessarily provide direct indications for the presence or the absence of a given structure by themselves. However, in the context of the predicted structure that is supported by phylogenetic analyses, such experiments can lend strong support for the proposed structure. More importantly, a disagreement between the biochemical and phylogenetic data flags problematic regions that need to be analyzed further.

In our prediction of the secondary structure of the

previously characterized helical structure, is used as negative control ($<10\%$ cleavage in renatured conditions). RH717 (lane 6) and RH761 (lane 8) are directed to interacting loops of the putative pseudoknot I and produce little-to-moderate cleavage. Probe RH740 (lane 7) does not mediate cleavage in the predicted, but not phylogenetically supported, stem of helix VI. RNA size markers (M) are indicated on the left. Closed triangle, unreacted input RNA (~ 1159 nt). Open triangle, RNA loading control. Note that lane 4 is slightly overexposed. For precise positions of all oligonucleotides used in the RNase H experiments, see Table S3.

S. cerevisiae TLC1 RNA, there is an almost perfect correlation between sequences predicted to be in helices by covariation and relative inaccessibility of such strands to RNase H mapping. Interestingly, all helices that were established by previous genetic experiments are indeed helices by our analyses. Such areas include a conserved bulged stem (IVc), the structure of which has been shown to be important for association of an essential factor for in vivo telomerase activity (Est1p, [13]). Resistance of the conserved stem IIa, a boundary element for telomerase-mediated reverse transcription [14, 29], is discussed above. The analyses here also show covariation and RNase H support for the predicted stem IIc. Previous analyses of this area strongly suggested a helix, and this stem was later shown to be important for Ku protein binding and telomerase recruitment [15, 16].

The predicted terminal loop on stem VIIId is clearly accessible to the mapping, while adjacent stems VIIb and VIIa are not (RH1059, RH1009, and RH980, Figure 5). Thus, while our data do not prove the precise organization of the region around stems VIIb–VIIId, they are consistent with the organization presented.

A special case was found to be present on the terminal loops of stems V and VI (locations RH717, RH740, RH761, and RH765, Figure 5A). These loops are predicted to be single-stranded, but clearly, the left sides of both loops are relatively inaccessible to RNase H probing (Figure 5B). At least for the loop of stem VI, this inaccessibility is unlikely due to a general occlusion of the site for oligonucleotide or enzyme access, since an oligonucleotide targeting the right side of loop VI directs quite efficient RNase H-mediated cleavage (oligo RH765, Figure 5B). Upon further inspection of the sequences in these loops, we noted an almost perfect complementarity between sequences overlapping those targeted by RH717 and RH761. In addition, this complementarity is highly conserved in the TLC1 sequences from all species analyzed here (see Figures 1 and 4). It is therefore tempting to speculate that these loops interact with each other to form a tertiary interaction. Intriguingly, this pseudoknot structure would lie in an area that was previously shown to interact with the catalytic subunit of the yeast telomerase (Est2p, [12]). A pseudoknotted structure in the vicinity of the predicted catalytic center comprising the template region is also a conserved element for vertebrate and ciliate telomerase RNAs [20, 23, 30]. Furthermore, a similar pseudoknot at a presumably analogous position was found to be an essential element for the function of *K. lactis* telomerase RNA [31]. Given that the yeast Est2p protein clearly has recognizable similarities to catalytic subunits of telomerases in other organisms [3], it would make sense that the associated RNAs would also display similarities. Thus, our structure is also consistent with the presence of a tertiary RNA interaction forming a pseudoknot in the area of TERT/Est2p interaction. In the *Saccharomyces* RNAs, this pseudoknot could be formed by an interaction of the terminal loops of stems V and VI.

Overall, the predicted structure could be divided into at least three functional regions. The first region is the central core, which may include the template region and stems III, IVa–IVc, V, and VI. This element would associate with the core proteins for enzymatic activity

in vivo (Est2p, Est1p, and perhaps others). It would also include a potential pseudoknot and a template boundary element (proximal part of stem IIa, [14]). A second region involves stems IIa–IIId. The distal end of this domain has been shown to be associated with the yeast Ku proteins, and a terminal deletion of stem IIc is tolerated but produces short telomeres [16]. Clearly, there is variability around the stems IIb and IIId, with some yeast species probably having additional stems (IIb_1 and IIId_1, see insets Figure 4). The complete area that includes stems IIc, IIId, and IIId_1 was deleted from the *S. cerevisiae* molecule, and in a separate experiment, stem IIb was also removed. For both cases, the remaining molecules complemented a *TLC1* deletion (data not shown). Thus, as proposed previously, the distal areas of stems IIb–d are nonessential but could function as a recruitment domain via the Ku proteins [15]. The third region (stems VIIa–VIIc and the single-stranded 3'-end) is separated from the first area by quite a large domain (stem I), which probably has functional subelements. From deletion studies, there is evidence that this third area is also nonessential [12]. However, a region in the telomerase RNA of *K. lactis* and which could be analogous to stems VII appears essential for *K. lactis* telomerase function [32]. Finally, the distal most 3'-end region, which includes the Sm binding site, clearly influences the stability of the RNA [11]. In addition, the existence of RNAs with extensions of up to 80 nt downstream of the major 3'-end near the Sm site suggests additional, and as yet unknown, processing events. It remains to be determined whether the rest of area three also contributes to RNA stability or whether this region is involved in other aspects of RNP function. For example, the mature yeast RNP is thought to function as a dimer [33], but the region(s) on the TLC1 RNA contributing to this multimerization are unknown.

At least certain parts of the structural elements of the yeast telomerase RNA could be nonessential [12, 32]. Precedence for an addition of large, yeast-specific, and nonessential sequences to otherwise conserved non-coding RNAs is also provided by the spliceosomal U1 and U2 snRNAs [34–37]. Much of the yeast U1 and U2 snRNA sequences are dispensable for function, and homologous sequences are absent from the vertebrate snRNAs. However, an important functional domain of the yeast U1 snRNA folds into a structure that is highly similar to that of the vertebrate RNA [34, 36]. Given the detailed structural organization of the yeast telomerase RNA presented here, it will be interesting to determine whether a much smaller functional RNA with conserved structural domains can be derived.

Conclusions

We present a detailed working secondary-structure model for the large *S. cerevisiae* telomerase RNA. The structure suggests subelements with functional similarities to the vertebrate and ciliate RNAs, as well as yeast-specific elements. The prediction now allows for a detailed molecular genetic and biochemical analysis of the telomerase RNP in a genetically tractable system.

Experimental Procedures

Yeast manipulations, analyses of nucleic acids, and PCR conditions for isolating *TLC1* homologs from the various yeast species used

standard procedures (see Supplemental Data for a detailed description).

Phylogenetic Analysis and Helix Nomenclature

Telomerase RNA sequences were aligned by using the computer program ClustalW with manual corrections. Segments of highly conserved regions were used as anchors for alignment. Putative helices were identified by visual search of covarying paired residues [17, 38, 39]. We considered a single base-pair position as covarying, if (1) the helix in which the base pair resides is provided by complementary sequences present in homologous segments of all molecules inspected, and (2) using at least six out of the eight molecules, two independent compensatory changes restoring usual pairings can be specified (canonical and wobble: G-C, A-U and G · U). Multiple covariations within a potential helix was accepted as a strong indication for the existence of that particular helix [17]. The phylogenetic analysis was aided by the use of X2s, an algorithm that identifies compensatory base changes in a set of properly aligned sequences [40], in conjunction with mFold, an RNA folding program based on lowest free-energy estimates of helix stability [41, 42]. Data from previously characterized structures were integrated in the initial analysis, allowing optimization of the structure. Where no conserved structure was possible, the RNA is either left single-stranded or is drawn out as proposed by mFold. Helices were numbered from 5' to 3' in order of their occurrence and the numbering was increased by one upon each passage of a multibranching loop, a pseudoknot loop, or a single-stranded region that does not form a loop. Helical segments separated only by internal loops (bulges) are considered to belong to the same helix. In the case of helices not belonging to the core structure but specific to certain species (Figure 4), an underscore and a number were appended to the number of the preceding helix.

Site-Specific RNase H Cleavage Assay

The DNA fragment for in vitro transcription of TLC1 RNA with the T7 MEGAscript transcription kit (Ambion) was obtained by PCR amplification by using oligonucleotides TLC1T7F and TLC1R (Table S3) and plasmid pADCEN36. RNase H cleavage was performed by using DNA oligonucleotides complementary to indicated regions of the *S. cerevisiae* TLC1 RNA (Figure 5; Table S3). The RNA substrate was heat denatured and renatured in cold folding buffer. The reaction mixture was incubated for 2 min on ice and for 30 min at 30°C. Prewarmed RNase H buffer, the specific probe, and 1.25 U of RNase H (USB) were added and the reaction mix incubated for 10 min at 30°C. Cleavage reactions were terminated by freezing in dry ice followed by heating to 90°C for 1 min. RNase H-treated TLC1 RNA was directly analyzed on a RNA 6000 Nano LabChip kit (Agilent Technologies). Chips and samples were prepared according to the manufacturer's instructions. Quantitative RNA detection by laser-induced fluorescence was usually documented by an electropherogram, which then was converted and displayed as a gel-like image.

Supplemental Data

Supplemental Data including detailed Experimental Procedures and three tables are available at <http://www.current-biology.com/cgi/content/full/14/13/1148/DC1/>.

Acknowledgments

We thank C. Greider and D. Gottschling for strains; particularly, E. Louis and J. Piskur for providing "sensu stricto" as well as "sensu lato" strains and useful discussions. S. Metaoui and F. Madore provided expert informatics support. We also thank D. Zappulla and V. Lundblad for discussing results prior to publication. This work was supported by grants from the Canadian Cancer Society (NCIC; 013235) to R.J.W., of the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; MOP67162) to S.A.E., and a core group grant of the CIHR (GRP6284). R.J.W. is a Chercheur-National and S.A.E. a Chercheur-Boursier of the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

Received: April 23, 2004

Revised: May 20, 2004

Accepted: May 21, 2004

Published online: May 27, 2004

References

- Chan, S.W., and Blackburn, E.H. (2002). New ways not to make ends meet: telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin. *Oncogene* 21, 553–563.
- de Lange, T. (2002). Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* 21, 532–540.
- Lingner, J., Hughes, T.R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V., and Cech, T.R. (1997). Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* 276, 561–567.
- Kelleher, C., Teixeira, M.T., Forstemann, K., and Lingner, J. (2002). Telomerase: biochemical considerations for enzyme and substrate. *Trends Biochem. Sci.* 27, 572–579.
- Singer, M.S., and Gottschling, D.E. (1994). TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science* 266, 404–409.
- Chen, J.L., and Greider, C.W. (2004). Telomerase RNA structure and function: implications for dyskeratosis congenita. *Trends Biochem. Sci.* 29, 183–192.
- Shippen-Lentz, D., and Blackburn, E.H. (1990). Functional evidence for an RNA template in telomerase. *Science* 247, 546–552.
- Taggart, A.K., and Zaklan, V.A. (2003). Telomerase: what are the Est proteins doing? *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 275–280.
- Lundblad, V. (2003). Telomere replication: an est fest. *Curr. Biol.* 13, R439–R441.
- Chapon, C., Cech, T.R., and Zaug, A.J. (1997). Polyadenylation of telomerase RNA in budding yeast. *RNA* 3, 1337–1351.
- Seto, A.G., Zaug, A.J., Sobel, S.G., Wolin, S.L., and Cech, T.R. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* telomerase is an Sm small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nature* 401, 177–180.
- Livengood, A.J., Zaug, A.J., and Cech, T.R. (2002). Essential regions of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase RNA: separate elements for Est1p and Est2p interaction. *Mol. Cell. Biol.* 22, 2366–2374.
- Seto, A.G., Livengood, A.J., Tzfati, Y., Blackburn, E.H., and Cech, T.R. (2002). A bulged stem tethers Est1p to telomerase RNA in budding yeast. *Genes Dev.* 16, 2800–2812.
- Seto, A.G., Umansky, K., Tzfati, Y., Zaug, A.J., Blackburn, E.H., and Cech, T.R. (2003). A template-proximal RNA paired element contributes to *Saccharomyces cerevisiae* telomerase activity. *RNA* 9, 1323–1332.
- Stellwagen, A.E., Haimberger, Z.W., Veatch, J.R., and Gottschling, D.E. (2003). Ku interacts with telomerase RNA to promote telomere addition at native and broken chromosome ends. *Genes Dev.* 17, 2384–2395.
- Peterson, S.E., Stellwagen, A.E., Diede, S.J., Singer, M.S., Haimberger, Z.W., Johnson, C.O., Tzoneva, M., and Gottschling, D.E. (2001). The function of a stem-loop in telomerase RNA is linked to the DNA repair protein Ku. *Nat. Genet.* 27, 64–67.
- Pace, N.R., Smith, D.K., Olsen, G.J., and James, B.D. (1989). Phylogenetic comparative analysis and the secondary structure of ribonuclease P RNA—a review. *Gene* 82, 65–75.
- James, B.D., Olsen, G.J., and Pace, N.R. (1989). Phylogenetic comparative analysis of RNA secondary structure. *Methods Enzymol.* 180, 227–239.
- Zaug, A.J., and Cech, T.R. (1995). Analysis of the structure of *Tetrahymena* nuclear RNAs in vivo: telomerase RNA, the self-splicing rRNA intron, and U2 snRNA. *RNA* 1, 363–374.
- Chen, J.L., Blasco, M.A., and Greider, C.W. (2000). Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell* 100, 503–514.
- Romero, D.P., and Blackburn, E.H. (1991). A conserved secondary structure for telomerase RNA. *Cell* 67, 343–353.
- Lingner, J., Hendrick, L.L., and Cech, T.R. (1994). Telomerase RNAs of different ciliates have a common secondary structure and a permuted template. *Genes Dev.* 8, 1984–1998.
- ten Dam, E., van Belkum, A., and Pleij, K. (1991). A conserved pseudoknot in telomerase RNA. *Nucleic Acids Res.* 19, 6951.
- Fischer, G., James, S.A., Roberts, I.N., Oliver, S.G., and Louis,

- E.J. (2000). Chromosomal evolution in *Saccharomyces*. *Nature* 405, 451–454.
25. Clifften, P.F., Hillier, L.W., Fulton, L., Graves, T., Miner, T., Gish, W.R., Waterston, R.H., and Johnston, M. (2001). Surveying *Saccharomyces* genomes to identify functional elements by comparative DNA sequence analysis. *Genome Res.* 11, 1175–1186.
 26. Lundblad, V., and Blackburn, E.H. (1993). An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues *est1*-senescence. *Cell* 73, 347–360.
 27. Bosoy, D., Peng, Y., Mian, I.S., and Lue, N.F. (2003). Conserved N-terminal motifs of telomerase reverse transcriptase required for ribonucleoprotein assembly in vivo. *J. Biol. Chem.* 278, 3882–3890.
 28. Yeh, L.C., and Lee, J.C. (1992). Structure analysis of the 5' external transcribed spacer of the precursor ribosomal RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 228, 827–839.
 29. Tzfati, Y., Fulton, T.B., Roy, J., and Blackburn, E.H. (2000). Template boundary in a yeast telomerase specified by RNA structure. *Science* 288, 863–867.
 30. Collins, K. (1999). Ciliate telomerase biochemistry. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 187–218.
 31. Tzfati, Y., Knight, Z., Roy, J., and Blackburn, E.H. (2003). A novel pseudoknot element is essential for the action of a yeast telomerase. *Genes Dev.* 17, 1779–1788.
 32. Roy, J., Fulton, T.B., and Blackburn, E.H. (1998). Specific telomerase RNA residues distant from the template are essential for telomerase function. *Genes Dev.* 12, 3286–3300.
 33. Prescott, J., and Blackburn, E.H. (1997). Functionally interacting telomerase RNAs in the yeast telomerase complex. *Genes Dev.* 11, 2790–2800.
 34. Kretzner, L., Krol, A., and Rosbash, M. (1990). *Saccharomyces cerevisiae* U1 small nuclear RNA secondary structure contains both universal and yeast-specific domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 851–855.
 35. Igel, A.H., and Ares, M., Jr. (1988). Internal sequences that distinguish yeast from metazoan U2 snRNA are unnecessary for pre-mRNA splicing. *Nature* 334, 450–453.
 36. Collins, C.A., and Guthrie, C. (2000). The question remains: is the spliceosome a ribozyme? *Nat. Struct. Biol.* 7, 850–854.
 37. Shuster, E.O., and Guthrie, C. (1988). Two conserved domains of yeast U2 snRNA are separated by 945 nonessential nucleotides. *Cell* 55, 41–48.
 38. Woese, C.R., Gutell, R., Gupta, R., and Noller, H.F. (1983). Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids. *Microbiol. Rev.* 47, 621–669.
 39. Gutell, R.R., Larsen, N., and Woese, C.R. (1994). Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiol. Rev.* 58, 10–26.
 40. Juan, V., and Wilson, C. (1999). RNA secondary structure prediction based on free energy and phylogenetic analysis. *J. Mol. Biol.* 289, 935–947.
 41. Mathews, D.H., Sabina, J., Zuker, M., and Turner, D.H. (1999). Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J. Mol. Biol.* 288, 911–940.
 42. Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31, 3406–3415.

Accession Numbers

The GenBank accession numbers for the *S. cerevisiae* (SK1), *S. paradoxus*, *S. cariocanus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, *S. bayanus*, and *S. pastorianus* *TLC1* sequences reported in this paper are AY639009, AY639015, AY639010, AY639011, AY639012, AY639013, and AY639014, respectively.

Supplemental Data

S1

A Phylogenetically Based Secondary Structure for the Yeast Telomerase RNA

Alain T. Dandjinou, Nancy Lévesque,
Stéphanie Larose, Jean-François Lucier,
Sherif Abou Elela, and Raymund J. Wellinger

Supplemental Experimental Procedures

Yeast Species and Nucleic Acids

The yeast strains used in this work are listed in Table S2. Yeast transformations were performed by using the LiAc/ssDNA/PEG method as described in [S1]. Haploid yeast strains were generated by sporulation in 0.5% KOAc at 26°C, followed by tetrad dissection. For all haploid cell analyses, strains were derived from four tetrads that showed the expected 2:2 segregation patterns. Genomic DNAs for PCR amplifications of *TLC1* loci from "sensu stricto" species were isolated by using a CsCl-method as described previously [S2]. Genomic DNA for Southern blot analysis was isolated by using a glass-bead method [S3]. RNA extractions were as described previously [S4]. PCR reactions were carried out on a Techgene thermal cycler. Oligonucleotides used in this work are listed in Table S3.

PCR Amplification, Plasmid Construction, and Sequencing

For cloning of the *TLC1* loci, initial rounds of PCR amplifications were performed with oligonucleotides designed to hybridize in the vicinity of the *TLC1* gene. The *S. cerevisiae* genes *PDX3* and *CSG2* flank the *TLC1* gene, and homologs can be found in more distant hemiascomycetous yeasts (Genolevures online Database: <http://cbi.labri.fr/Genolevures/Genolevures.php>). Therefore, we reasoned that such genes would be present in all species of the "sensu stricto" complex, which are the yeast species most closely related to *S. cerevisiae*. Moreover, chromosomal synteny between species of this group is very high and we assumed it was maintained around the *TLC1* locus. Thus, based on highly conserved sequences of *PDX3* and *CSG2* genes, forward and reverse primers were designed. PCR fragments were cloned, sequenced, and new primers, now specific for each species, were subsequently designed as such to amplify full-length candidate *TLC1* homologs. The primer pairs used in a final round of PCR can be found in Table S3. Each 25 µl reaction contained 10 mM Tris-Cl (pH 8.8), 25 mM KCl, 5 mM (NH₄)₂SO₄, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM each dNTP, 1.5–2.5 U Pwo polymerase (Roche), 20 pmol of each primer, and 50 ng of genomic DNA from the appropriate species. Amplification was carried out with one cycle at 94°C for 2 min; 35 cycles at 94°C for 15 s, 50°C for 30 s, and 72°C for 2 min; and one final cycle at 72°C for 5 min. Reaction products were digested by using unique restriction-enzyme sites added to each primer, gel-purified with QIAquick gel extraction kits, and cloned into pADCE26. pADCE26 is derived from pRS316, into which a 327-bp fragment containing the transcription terminator region of the *ADH1* gene was inserted [S5, S6]. Candidate telomerase RNA loci from *S. cerevisiae* (S288C), *S. cerevisiae* (SK1), *S. paradoxus*,

S. cariocanus, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, *S. bayanus*, and *S. pastorianus* were cloned into pADCE26 to generate plasmids pADCE36, pADCE35, pADCE42, pADCE43, pADCE44, pADCE45, pADCE46, and pADCE49, respectively. For each locus, both strands of inserts derived from two independent PCR reactions and clones were sequenced. The methods used for the phylogenetic analyses are described in the Supplemental Experimental Procedures [S7–S14].

Primer Extensions

Approximately 2 pmol of radiolabeled oligonucleotide primer complementary to nucleotides 33–49 or 52–68 relative to the previously proposed 5'-end of the *S. cerevisiae* *TLC1* RNA or to homologous regions of the other *Saccharomyces* RNAs were annealed to 5–15 µg of total yeast RNA at 37°C and extended with avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Roche) at 42°C. Products were analyzed by SDS-PAGE. The same primers were used to determine the positions of the primer extension stops by direct comparison with dideoxynucleotide chain termination reactions on the appropriate genomic clone on the same gel. As a positive control for reverse transcriptase activity, an in vitro-generated sense RNA starting at position –122 in the *S. cerevisiae* *TLC1* locus was used.

RNA Transcription, Site-Specific Oligonucleotide/RNase H Cleavage, and Capillary Electrophoresis on a Chip

The DNA fragments for in vitro transcription of *TLC1* RNA were obtained by PCR amplification of plasmid pADCE36 by using oligonucleotides *TLC1T7F* and *TLC1R* (Table S3). The fragment of the expected size was gel purified and then used to generate *TLC1* RNA with the T7 MEGAscript transcription kit (Ambion). The *TLC1* RNA transcript was phenol/chloroform extracted, isopropanol precipitated, and resuspended in water at a final concentration of 6 pmol/µl (~2 µg/µl).

RNase H cleavage was performed by using DNA oligonucleotides complementary to indicated regions of the *S. cerevisiae* *TLC1* RNA (Figure 5; Table S3). The *TLC1* RNA substrate was heated to 90°C for 1 min and 1.25 µl (1.4 pmol, ~500 ng) of denatured RNA was added to 1.25 µl of cold folding buffer (100 mM Tris-Cl [pH 8.0], 20 mM MgCl₂, 20 mM NaCl, and 2 mM DTT). The reaction mixture was incubated for 2 min on ice and for 30 min at 30°C. 2.5 µl of prewarmed RNase H buffer (50 mM Tris-Cl [pH 8.0], 10 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, and 1 mM DTT), 1.4 pmol of oligo probe and 1.25 U of RNase H (USB) was added and the reaction mix incubated for 10 min at 30°C. Cleavage reactions were terminated by freezing in dry ice followed by heating to 90°C for 1 min. Three control reactions were routinely

Table S1. Pairwise Comparisons of the Telomerase RNA Sequences Derived from *Saccharomyces* "Sensu Stricto" Species

	S288C	SK1	<i>S. paradoxus</i>	<i>S. cariocanus</i>	<i>S. mikatae</i>	<i>S. kudriavzevii</i>	<i>S. bayanus</i>	<i>S. pastorianus</i>
S288C	—	0.977	0.783	0.777	0.702	0.656	0.590	0.589
SK1	18	—	0.78	0.772	0.699	0.649	0.589	0.586
<i>S. paradoxus</i>	187	187	—	0.945	0.748	0.682	0.628	0.586
<i>S. cariocanus</i>	192	195	59	—	0.747	0.682	0.629	0.618
<i>S. mikatae</i>	276	280	236	239	—	0.703	0.632	0.618
<i>S. kudriavzevii</i>	321	326	301	303	312	—	0.653	0.644
<i>S. bayanus</i>	367	365	336	336	354	333	—	0.895
<i>S. pastorianus</i>	351	355	328	333	353	326	106	—

The upper right half of the table indicates homology values for pairwise comparisons. H value = matches/(matches + mismatches + gaps/2) [S18]. Matches, mismatches, and gaps are based on the primary sequence alignment of all telomerase RNA sequences in Figure 1. The lower left half of the table indicates absolute numbers of mismatches (nucleotide distances).

Table S2. Yeast Strains Used in This Study

Species	Designation	Relevant Genotype	Source
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CSHY76	Mata/Mat α ade2/ade2 ura3/ura3 leu2/leu2 his3/his3 trp1/trp1 tlc1::LEU2/TLC1 rad52::TRP1/RAD52	C. Greider (Baltimore, Maryland) [S15]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S288C (BY)	Mata ade2 his3 leu2 lys2 met1 trp1 ura3	D. Gottschling (Seattle, Washington) [S19]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SK1	Mata/Mat α	E. Louis (Leicester, UK) [S20, S21]
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	CBS 432	Mata/Mat α	E. Louis (Leicester, UK) [S20, S21]
<i>Saccharomyces cariocanus</i>	UFRJ 50791	Mata/Mat α	E. Louis (Leicester, UK) [S20, S21]
<i>Saccharomyces mikatae</i>	IFO 1815	Mata/Mat α	E. Louis (Leicester, UK) [S20, S21]
<i>Saccharomyces kudriavzevii</i>	IFO 1802	Mata/Mat α	E. Louis (Leicester, UK) [S20, S21]
<i>Saccharomyces bayanus</i>	CBS 7001	Mata/Mat α	E. Louis (Leicester, UK) [S20, S21]
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	DBVPG 6560	Mata/Mat α	E. Louis (Leicester, UK) [S20, S21]

performed for all series of experiments: (1) omitting a DNA oligonucleotide from the reaction, (2) using a DNA oligonucleotide targeting a well-characterized helical region (reduced accessibility; for example proximal portion of stem IIa, see text), and (3) using a DNA oligonucleotide targeting the single-stranded template region (full accessibility).

RNAse H-treated TLC1 RNA was directly analyzed on a RNA 6000 Nano LabChip kit (Agilent Technologies). Chips and samples were prepared according to the manufacturer's instructions. Briefly, the gel matrix was prepared by adding 1 μ l of provided dye to 65 μ l of gel and the gel/dye mixture was filtered. 9 μ l of gel/dye mixture were successively loaded into the priming well and into the buffer wells. 5 μ l of RNA 6000 Nano marker was loaded in sample and ladder wells followed by addition of 1 μ l of denatured ladder and 1 μ l of the cleavage reaction mix (0.25 pmol \approx 100 ng RNA). The chip was vortexed and placed in the Agilent 2100 Bioanalyzer for capillary electrophoresis. Quantitative RNA detection by laser-induced fluorescence is usually documented by an electropherogram, which then is converted and displayed as a gel-like image.

Senescence Assays and Telomere-Length Analysis

Diploid strain CSHY76, in which one copy of the *TLC1* and *RAD52* genes was replaced by *LEU2* and *TRP1* genes, respectively [S15], was transformed with plasmids containing candidate *TLC1* homologs (pADCN36, pADCN35, pADCN42, pADCN43, pADCN44, pADCN45, pADCN46, pADCN49) or an empty plasmid (pADCN26). After sporulation and tetrad dissection, single spores carrying a homolog-containing plasmid were restreaked on medium lacking uracil to assay for rescue of senescence. Single colonies from non-senescent strains were picked after 100 generations and streaked on 5-FOA (5-Fluoro-orotic acid) medium to select for cells that had lost the complementing plasmid [S16]. Such cells were then successively restreaked to assay for senescence and confirm plasmid-dependent survival. In parallel, single colonies transformed with candidate telomerase RNA genes were picked 20, 40, 60, 80, and 100 generations after sporulation and grown for \sim 10 generations in 5 ml of medium lacking uracil. Cells were harvested, genomic DNA isolated, and digested with *Xho*I. 1 μ g of the *Xho*I-digested DNA was separated on a 1% agarose gel and transferred to nylon membrane (Amersham Hybond-N+) by capillary. The appropriate bands were visualized by hybridization at 42°C with a random-primed telomeric probe.

Northern Blot Analysis

15 μ g of RNA derived from appropriate cultures were separated on a 4% acrylamide/8M urea gel and electrophoretically transferred to a nylon membrane (Amersham Hybond-N+). Blots were UV irradiated, stained with methylene blue to locate 18 and 25S rRNAs [S17], and then probed with random prime-labeled fragments that specifically detect the appropriate *TLC1* homolog.

Supplemental References

- S1. Gietz, R.D., and Woods, R.A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.* 350, 87–96.
- S2. Rose, M.D., Winston, F., and Hieter, P. (1990). Preparation of yeast genomic DNA (CsCl method). In *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual* (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 133–135.
- S3. Dionne, I., and Wellinger, R.J. (1996). Cell cycle-regulated generation of single-stranded G-rich DNA in the absence of telomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13902–13907.
- S4. Rose, M.D., Winston, F., and Hieter, P. (1990). Yeast RNA isolation. In *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual* (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 140–142.
- S5. Sikorski, R.S., and Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19–27.
- S6. Ammerer, G. (1983). Expression of genes in yeast using the ADCl promoter. *Methods Enzymol.* 101, 192–201.
- S7. Woese, C.R., Gutell, R., Gupta, R., and Noller, H.F. (1983). Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids. *Microbiol. Rev.* 47, 621–669.
- S8. Pace, N.R., Smith, D.K., Olsen, G.J., and James, B.D. (1989). Phylogenetic comparative analysis and the secondary structure of ribonuclease P RNA—a review. *Gene* 82, 65–75.
- S9. Gutell, R.R., Larsen, N., and Woese, C.R. (1994). Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiol. Rev.* 58, 10–26.
- S10. Juan, V., and Wilson, C. (1999). RNA secondary structure prediction based on free energy and phylogenetic analysis. *J. Mol. Biol.* 289, 935–947.
- S11. Mathews, D.H., Sabina, J., Zuker, M., and Turner, D.H. (1999). Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J. Mol. Biol.* 288, 911–940.
- S12. Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31, 3406–3415.
- S13. Wuyts, J., Van de Peer, Y., and De Wachter, R. (2001). Distribution of substitution rates and location of insertion sites in the tertiary structure of ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* 29, 5017–5028.
- S14. De Rijk, P., Caers, A., Van de Peer, Y., and De Wachter, R. (1998). Database on the structure of large ribosomal subunit RNA. *Nucleic Acids Res.* 26, 183–186.
- S15. Le, S., Moore, J.K., Haber, J.E., and Greider, C.W. (1999). RAD50 and RAD51 define two pathways that collaborate to maintain telomeres in the absence of telomerase. *Genetics* 152, 143–152.
- S16. Boeke, J.D., Trueheart, J., Natsoulis, G., and Fink, G.R. (1987). 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol.* 154, 164–175.

Table S3. Synthetic Oligonucleotides Used in This Study

Name	Sequence (5'→3')
CERPDX3 ^a	GGGTACACTAGTAGCCTTTCTAGAGGTTCC (SpeI)
CERCSG2 ^a	AACAGAATTCGGGAAGGTAAATACCACC (EcoRI)
PARPDX3 ^a	CGCGGATCCCTCCTCAGCTTGTTTAGTCATTG (BamHI)
PARCSG2 ^a	TGCGTCGACCTCGGGGAAGGTAAATCCAC (Sall)
CARCSG2 ^a	TGCGTCGACCTCGGGAAGGTAAATACCAC (Sall)
MIKPDX3 ^a	CGCGGATCCCTCCTCGGCTTGTTTAGTCATTG (BamHI)
MIKCSG2 ^a	TGCGTCGACCTCGGTGAAGGCAAATATCAC (Sall)
KUDPDX3 ^a	CGCGGATCCCTCCTCTGATTGCTTAGTCATTG (BamHI)
BAYCSG2 ^a	TGCGTCGACCTAGGTGAAGGTAAATACCAC (Sall)
BAYPDX3 ^a	CGCGGATCCCTCCTCGGATTGCTTAGTCATTG (BamHI)
PASPDX3 ^a	ATCCTGATCACTCCTCGGATTGCTTAGTCATTG (BclII)
ADH1TERMF ^a	CCGGAATTCGAGCTCAAGCTTGACCTTCTCGCC (SacI)
ADH1TERMR ^a	ATCCGCGGACTAGTGGCCGGTAGAGGTGTGG (SpeI)
PXCEP23 ^b	CAGCCATTGACATTTTC
PXCEP39 ^b	CGATTAAGCAAACGCAAC
PXPAR39 ^b	CAACTAAGCAAACGCAAC
PXCAR39 ^b	CAACTAAGCAAACGCGAC
PXMIK40 ^b	GCTAGAAAGCAAATGTAAC
PXKUD39 ^b	CTAGTAACTAAACGTGAC
PXBAY39 ^b	GGGCGGGCAAACATACC
TLC1T7F ^c	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGAGGAAGATAGGTACC
TLC1R ^c	AAATGTTTCCAAAAATTATCTAAATGC
RH97 ^d	GATGGAAACTCAAACG (helix I)
RH119 ^d	CCAAATTTCTGAGGCC (helix I)
RH133 ^d	CCATCGAGTGCCTACC (helix IIa)
RH224 ^d	CTGACACCAGCATACTC (helix IIb)
RH316 ^d	TTACGGTTTGCAATTTTC (helix IIc)
RH336 ^d	TAGCAGTGTTTAAG (helix IId)
RH387 ^d	GAAGGAATAACAGGA (helix IIId ₁)
RH459 ^d	GTGTGTGGGTGTGGT (template)
RH557 ^d	CAGTGTCAGAAA (helix IVb)
RH589 ^d	TCTAACTTAACTCC (helix IVc)
RH603 ^d	TCTGTTTGCAAAT (helix IVc)
RH717 ^d	ACTAGAATA (helix V)
RH740 ^d	GGCAAAATCTACTG (helix VI)
RH761 ^d	GTGGGATTTATTCT (helix VI)
RH765 ^d	TTGTAGTGGGATT (helix VI)
RH867 ^d	ACCTACTCGTA (helix I)
RH897 ^d	TGCTTAAGAAAGGACACC (helix I)
RH916 ^d	CGCAAACCTAACCG (helix VIIa)
RH951 ^d	CGTTCTTGATCTTGTC (helix VIIa)
RH980 ^d	AAAACCATCTTGAAAA (helix VIIb)
RH1009 ^d	TGATCATCAAAGTAGTTTA (helix VIIb)
RH1059 ^d	CGTTCCTTCGCG (helix VIIId)

^aPCR primer oligonucleotides. Underlined sequences are restriction sites which were added for subcloning. The corresponding restriction enzyme is indicated in parenthesis.

^bPrimer extension oligonucleotides.

^cOligonucleotides used for PCR product generation, which served as template for RNA transcription in vitro. T7 RNA polymerase promoter is underlined. Base in bold is the first nucleotide incorporated into RNA during transcription.

^dRNase H oligonucleotide probes. Numbers indicate the positions of the first base on TLC1 RNA according to the numbering system defined in Figures 1 and 3. The targeted structure is indicated in parenthesis. Oligonucleotides for RNase H probing were HPLC purified or gel purified.

- S17. Good, L., Elela, S.A., and Nazar, R.N. (1994). Tetrahymena ribozyme disrupts rRNA processing in yeast. *J. Biol. Chem.* 269, 22169–22172.
- S18. Sogin, M.L., Ingold, A., Karlok, M., Nielsen, H., and Engberg, J. (1986). Phylogenetic evidence for the acquisition of ribosomal RNA introns subsequent to the divergence of some of the major Tetrahymena groups. *EMBO J.* 5, 3625–3630.
- S19. Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., and Boeke, J.D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14, 115–132.
- S20. Naumov, G.I., James, S.A., Naumova, E.S., Louis, E.J., and Roberts, I.N. (2000). Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 1931–1942.
- S21. Fischer, G., James, S.A., Roberts, I.N., Oliver, S.G., and Louis, E.J. (2000). Chromosomal evolution in *Saccharomyces*. *Nature* 405, 451–454.

Eternity is long, especially towards the end

Woody Allen